

Etablierung eines tierexperimentellen Kurzzeitschädigungsmodells zur Untersuchung von Therapie- und Präventionsoptionen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Anne Breitrück, geb. am 15.09.1980 in Rostock

aus Rostock

Gutachter:

1. Gutachter:
Prof. Dr. Ulrike Gimsa
Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN)
2. Gutachter:
Prof. Dr. Claus Kerkhoff
Fachgebiet Biomedizinische Grundlagen, Universität Osnabrück
3. Gutachter:
Prof. Dr. Robert Jaster
Abteilung für Gastroenterologie, Universitätsmedizin Rostock

Datum der Einreichung: 16. Juni 2015

Datum der Verteidigung: 29. Januar 2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Immunorgan Darm	1
1.1.1 Anatomischer und histologischer Aufbau des Darms.....	1
1.1.2 Das Immunsystem des Darms (GALT)	2
1.1.3 Das intestinale Epithel des Darms.....	4
1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)	5
1.2.1 Colitis Ulcerosa (CU).....	7
1.3 Therapieansätze in der UC.....	12
1.3.1 Konventionelle Strategien	12
1.3.2 Alternative Strategien	13
1.4 Chemisch induzierte Tiermodelle für die CU.....	15
1.4.1 Natriumdextransulfat (DSS).....	15
1.4.2 Trinitrobenzoesulfonsäure (TNBS)	16
1.4.3 2-Iodacetamid (IA).....	16
1.4.4 <i>In situ</i> -Perfusion	16
1.5 Mineral-Silikate.....	17
1.5.1 Eigenschaften von Mineralsilikaten	18
1.5.2 Verwendung in der Humanmedizin.....	18
1.5.3 Friedländer Mineralsilikate.....	19
2 Zielstellung	21
3 Material und Methoden	22
3.1 Geräte, Labormaterialien, Chemikalien und Reagenzien	22
3.1.1 Geräte	22
3.1.2 Labormaterialien	23
3.1.3 Chemikalien	24
3.1.4 verwendete Kits.....	26

3.1.5	verwendete Antikörper für die Immunhistochemie	27
3.1.6	Stimulanzen	27
3.1.7	Enzyme	27
3.1.8	Puffer	28
3.1.9	Lösungen und Puffer für EMSA	28
3.1.10	Lösungen für RNA-Elektrophorese	30
3.2	Tiermodell	31
3.2.1	Tiergruppen	32
3.2.2	Organentnahme und Gewebeasservierung	33
3.3	Biochemische Methoden	33
3.3.1	Immunhistologische Färbungen	33
3.4	Molekularbiologische Methoden	34
3.4.1	Isolierung der RNA	34
3.4.2	Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration	34
3.4.3	Kontrolle der RNA in Agarose-Gelelektrophorese	34
3.4.4	Reverse Transkription	35
3.4.5	Quantitative Real-time-Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
3.4.6	Auswertung der quantitativen Real-Time-PCR	37
3.4.7	Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)	37
3.5	Methoden der Zellkultur	39
3.5.1	Auftauen von Zellen	39
3.5.2	Kryokonservierung von Zellen	39
3.5.3	Zellzahlbestimmung	40
3.5.4	Kultivierung von Caco-2-Zellen	40
3.5.5	Kultivierung von SW480- und THP-1-Zellen	40
3.5.6	Kultivierung von IEC-6-Zellen	41
3.5.7	Kultivierung und Passagieren von Zellen	41
3.5.8	Herstellung der Tonsuspensionen	41
3.5.9	Proliferationsassay (BrdU-Test)	41

3.5.10	Vitalitätsassay (WST-Test)	42
3.5.11	Stimulation mit Zytokinen	42
3.5.12	Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	42
3.5.13	Zellkultivierung auf Transwell-Einsätzen.....	43
3.5.14	Stimulation der Caco-2-Zellen auf Transwell-Einsätzen mit pro- inflammatorischen Zytokinen	43
3.5.15	Caco-2-Kokultur mit THP-1-Makrophagen.....	44
3.5.16	Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER)	44
3.6	Statistische Methoden	45
4	Ergebnisse.....	46
4.1	Etablierung des Kurzzeitschädigungsmodells.....	46
4.1.1	Perfusion eines Darmsegments mit Kontrollmedium	46
4.1.2	Induktion einer mukosalen Entzündung mittels DSS- und TNBS-Perfusion.....	46
4.1.3	Induktion einer mukosalen Entzündung mittels IA	47
4.1.3.1	Effekte von IA auf die Histologie.....	47
4.1.3.2	Effekt von IA auf die Infiltration von CD68 ⁺ -Zellen	50
4.1.3.3	Expression von Targetgenen.....	51
4.2	Effekte verschiedener Therapeutika auf die IA-induzierte mukosale Entzündung...53	
4.2.1	Die Perfusion mit den Therapeutika führte zur einer Reduktion der IA- induzierten histologischen Veränderungen.....	53
4.2.2	Die Perfusion mit den Therapeutika führte zur einer geringen Abnahme der IA- induzierten CD68 ⁺ -Zell-Infiltration	56
4.2.3	Die Perfusion mit den Therapeutika verringerte die IA-induzierte mRNA- Expression von IL-6, IL-10, MCP-1 und iAP positiv	56
4.3	Untersuchungen zu den molekularen Wirkmechanismen der Tonmineralien.....	57
4.3.1	Untersuchungen zur Toxizität von Friedländer Mineral-Silikaten	58
4.3.2	Untersuchung zur Wirkung von Friedländer Tonmineralien auf die Expression von Zytokinen.....	60
4.3.3	Untersuchungen zur Wirkung von Friedländer Mineral-Silikaten auf die epitheliale Barriere	63
4.3.4	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) zu NF-κB in IEC-6	66

4.3.4.1	Die NF- κ B Aktivierung durch Lipid A	66
4.3.4.2	Die NF- κ B-Aktivierung durch LPS	67
5	Diskussion	69
5.1	Die Etablierung des Kurzzeitschädigungsmodells	69
5.1.1	Die Perfusion mit IA induzierte Kolitis-ähnliche Veränderungen in der intestinalen Mukosa.....	70
5.1.2	Die Perfusion mit IA induzierte eine erhöhte Infiltration von CD68 ⁺ -Zellen.....	71
5.1.3	Die Perfusion mit IA induzierte eine erhöhte Expression von Zytokinen und führt zu einer verminderten Expression der intestinalen Alkalischen Phosphatase	73
5.1.4	Die Vorteile des Kurzzeitschädigungsmodells	75
5.2	Die Wirkung von Therapeutika auf die IA-induzierte Kolitis.....	75
5.2.1	Dexamethason	76
5.2.2	Mutaflor (EcN)	77
5.2.3	Resormin.....	80
5.3	Der Einfluss der Friedländer Silikate auf humane intestinale Epithelzellen <i>in vitro</i> ..	83
5.3.1	Toxizitätspotential	83
5.3.2	Wirkung auf Zytokine.....	83
5.3.3	Wirkung auf die intestinale Barriere	85
5.4	Putativer Wirkmechanismus von Resormin unter Berücksichtigung der <i>in vitro</i> - Daten	89
6	Ausblick	91
7	Zusammenfassung.....	93
8	Summary.....	95
9	Literaturverzeichnis	97
10	Abbildungsverzeichnis.....	118
11	Tabellenverzeichnis.....	119
	Veröffentlichungen.....	120
	Danksagung.....	122
	Eidesstattliche Erklärung.....	123

Abkürzungen

5-ASA	5-Aminosalicylsäure
ABC	Avidin Biotin Complex
AJ	Adherens Junction
APC	Antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CU	Colitis Ulcerosa
CXCL	chemokine (C-X-C motif) ligand
DAB	3,3 Diaminobenzidin
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DGVS	Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSS	Natriumdextransulfat (<i>Dextran sulphate sodium</i>)
EcN	Escherichia coli Nissle 1917
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
FAO	Food and Agriculture Organization
FKS	Fetales oder Fötales Kälberserum
GALT	darmassoziiertes Immunsystem (<i>gut-associated lymphoid tissue</i>)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GJ	Gap Junction
HLA	Humane Leukozytenantigen (<i>Human-Leukocyte-Antigen</i>)
HPRT	Hypoxanthine-phosphoribosyl transferase
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IA	Iodoacetamid
iAP	Intestinale alkalische Phosphatase
IEL	Intraepithelialer Lymphozyt
IFN	Interferon
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MAdCAM	Schleimhaut-spezifisches Addressin-Zelladhäsionsmolekül (<i>mucosal adressin cell adhesion molecule</i>)
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (<i>mucosa associated lymphatic tissue</i>)
MC	Morbus Crohn
MCP	Monocyte chemoattractant-protein
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
min	Minute
MLN	Mesenterialer Lymphknoten (<i>mesenteric lymph node</i>)
mm	Millimeter
mRNA	Messenger RNA
MW	Mittelwert

NFκB	nuclear factor kappa-light-chaine-enhancer of activated B-cells
ng	Nanogram
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PET	Polyethylenterephthalat
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetat
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
s. o.	siehe oben
SEM	standard error of the mean
STAT	signal transducer and activator of transcription
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEER	transepithelialer elektrischer Widerstand (<i>transepithelial electrical resistance</i>)
TGFβ	Transforming growth factor beta
TJ	Tight Junction
TLR	Toll-like Rezeptor
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
vs.	versus
WHO	World Health Organisation
WST	4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen-disulfonat

1 Einleitung

1.1 Das Immunorgan Darm

1.1.1 Anatomischer und histologischer Aufbau des Darms

Der Darm ist ein Teil des Verdauungstraktes und in Dün- und Dickdarm unterteilt. Er kann bei einem ausgewachsenen Menschen bis zu 8 m lang werden.

Der Dünndarm mit etwa 5–6 m Länge schließt sich dem Magenausgang an und ist von proximal nach distal in Duodenum, Jejunum und Ileum gegliedert. Hier wird die durch den Magen angesäuerte Nahrung enzymatisch in ihre einzelnen Bestandteile wie Eiweiße, Fette, Vitamine, Kohlenhydrate, Salze, Mineralstoffe und Wasser zerlegt. Die lange Kontaktzeit des Nahrungsbreies mit der resorbierenden Darmschleimhaut gewährleistet die Aufnahme der Stoffe über die Zellen der Darmschleimhaut und den Weitertransport in das Blut. Der Dünndarm ist mit einem hochprismatischen, einschichtigen Epithel ausgekleidet (Lamina epithelialis mucosae), welches Zotten und Krypten bildet. Zotten sind - je nach Dünndarmabschnitt - 0,2-1 mm hohe, fingerförmige Erhebungen, denen das Oberflächenepithel, besetzt mit Mikrovilli für die Resorptionsfunktion aufsitzt. Krypten sind Einsenkungen des Epithels und Orte der Zellerneuerung. Hier entwickeln sich aus multipotenten Stammzellen neue Zellen, die an die Zottenspitze migrieren und sich dabei in Enterozyten (Epithelzellen), Becherzellen und endokrine Zellen differenzieren. Die Lebensdauer dieser Zellen beträgt etwa 5 Tage und apoptotische Zellen werden an der Zottenspitze ins Lumen abgeschilfert. Neben den Epithelzellen sind auch schleimsezernierende Zellpopulationen zu finden, die Becherzellen im Zottenepithel und die Paneth-Zellen an der Kryptenbasis. Unterhalb des Epithels befindet sich die Lamina propria mucosae, gefolgt von der Lamina muscularis mucosae. Zusammen bilden die bisher genannten Gewebsschichten die Mucosa (Tunica mucosa). Daran schließt sich die Submukosa (Tela submucosa) an, eine dichtere Bindegewebsschicht, in der - je nach Dünndarmabschnitt - solitäre Lymphfollikel (Peyer-Plaques) vorhanden sind. Darunter befindet sich die Muscularis (Tunica muscularis) mit einer zirkulären und einer longitudinalen Schicht glatter Muskelzellen. Den Abschluss bildet die Tunica serosa (Abb. 1). In der Dünndarmschleimhaut sind regionale Unterschiede von proximal nach distal zu finden. So nimmt die Zottendichte von Duodenum nach Ileum ab, während die Zahl der Becherzellen und der solitären Lymphfollikel zunimmt.

Der etwa 1,5 m lange Dickdarm ist eingeteilt in Blinddarm und Grimmdarm (Kolon), bestehend aus aufsteigendem Darm (Colon ascendens), Querdarm (Colon transversum), absteigendem Darm (Colon descendens), Sigmoid und Rektum. Hauptaufgaben des Kolons sind die Resorption von Wasser und Elektrolyten aus dem Nahrungsbrei, der mikrobielle Abbau nicht-resorbierbarer Nahrungsreste und die Weiterleitung der Fäzes in das Rektum.

Der histologische Aufbau des Kolons von innen nach außen setzt sich ebenfalls aus den vier Schichten Tunica mucosa, Tela submucosa, Tunica muscularis und Tunica serosa,

beziehungsweise Tunica adventitia (C. ascendens, C. descendens) zusammen (Abb. 1). Ein entscheidender Unterschied zum Dünndarm ist das Fehlen von Zotten. Die Mukosa ist geprägt von tiefen, dicht stehenden Krypten und einer Vielzahl schleimsekretierender Becherzellen. Paneth-Zellen befinden sich nur noch lokal im proximalen Kolon. Ein weiterer Unterschied ist die kräftiger ausgeprägte Muscularis.

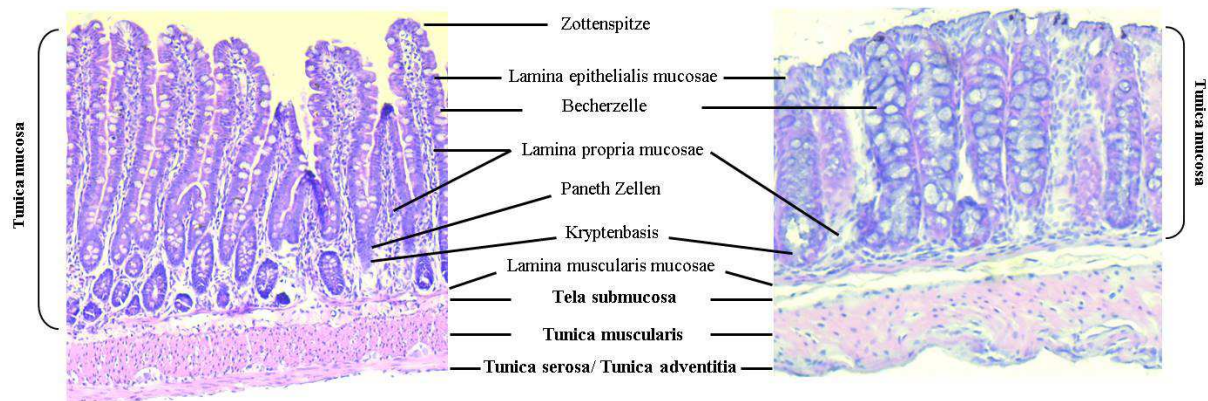


Abb. 1 Histologischer Aufbau des Dünndarms und des Dickdarms.

In der Bindegewebsschicht (Lamina propriae mucosae) sind zahlreiche Makrophagen, Plasmazellen und weitere Immunzellen zu finden. Die Submukosa enthält Blutgefäße, Lymphknoten und vor allem Fettgewebe.

Die Schleimhaut des humanen Intestinaltrakts ist die größte Resorptionsfläche des Körpers. Sie ist im ständigen Kontakt mit Nahrungsproteinen und Mikroorganismen, wobei letztere in einer außerordentlich hohen Konzentration (10^{12} pro cm^3) vorliegen. Diese massive Antigenexposition erfordert spezifische Mechanismen, um symptomatische Immunreaktionen auf fremde Antigene zu verhindern. Ein lokales Immunsystem, die Epithelzellen sowie luminalen Faktoren schaffen ein Gleichgewicht zwischen Toleranz und protektiver Immunität. Eine Störung dieses Gleichgewichts kann die Entstehung gastrointestinaler Erkrankungen verursachen (siehe 1.2) [2].

1.1.2 Das Immunsystem des Darms (GALT)

Die Ansammlung von lymphatischem Gewebe unterhalb von Schleimhäuten wird als Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (engl. mucosa associated lymphatic tissue, MALT) bezeichnet. Dieses findet sich in der Nasen-, Bronchial- und Vaginalschleimhaut sowie im Darm, wo es als darmassoziiertes lymphatisches Gewebe (engl. gut-associated lymphatic tissue, GALT) bezeichnet wird. Dieses hochspezialisierte Immunsystem ist in besonderer Weise zu Toleranzreaktionen zwischen der residenten Mikroflora und dem Epithel befähigt. Zu dem GALT gehören intraepitheliale Lymphozyten, Lymphfollikel, Peyer'sche Plaques und freie immunkompetente Zellen in der Lamina propria. Aufgrund der hohen Anzahl lymphatischer Zellen ist der Darm das größte lymphatische Organ.

Mit Zunahme der mikrobiellen Antigen-Besiedlung im Darm von proximal nach distal intensiviert sich der Kontakt zwischen dem Epithel und der darunterliegenden Mukosa sowie

den luminalen Mikroorganismen. In diesen Regionen ist eine hohe Dichte von Abwehrzellen in der Lamina propria mucosae vorzufinden, die sich als Solitärfollikel oder aggregierte sekundäre Follikel zusammenlagern. Ansammlungen von Lymphfollikeln, die sogenannten Peyer'schen Plaques des Dünndarms, nehmen in der Häufigkeit nach distal zu. Die meisten und größten Plaques sind im terminalen Ileum zu finden. Im Kolon sind solitary Follikel vorhanden, wobei auch hier die Häufigkeit nach distal zunimmt. Morphologisch sind die Follikel des Dünndarms und des Kolons weitgehend ähnlich aufgebaut. Sie bestehen aus lymphatischem Gewebe mit zahlreichen B- und T-Lymphozyten, Keimzentren, unreifen dendritischen Zellen sowie einigen Makrophagen. Sie reichen von der Lamina propria mucosae bis in die Submucosa hinein. Die dem Lumen vorgewölbte Seite wird Dom genannt. Ein spezialisiertes Epithel ohne Krypten und Zotten, welches nur wenige Becherzellen und keine Paneth-Zellen enthält, bildet die Abgrenzung zur luminalen Seite. Innerhalb des Epithels sind spezialisierte M-Zellen zu finden, die als Antigentransporter fungieren [3]. Mittels luminaler Endozytose und abluminaler Exozytose werden Antigene unprozessiert an antigenpräsentierende Zellen (APC), wie Makrophagen und dendritische Zellen (DC), abgegeben. Nicht-migratorische dendritische Zellen können mithilfe ihrer langen transepithelialen Fortsätze Antigene direkt aus dem Darmlumen aufnehmen [4]. Ein Teil der aufgenommenen Antigene wird sofort von den Makrophagen eliminiert, während nicht-phagozytierte Antigene die lokalen B- und T-Zellen aktivieren [5].

Die aktivierten B-Zellen proliferieren in Keimzentren, welche in den Peyer'schen Plaques des Dünndarms ständig ausgeprägt sind. Anschließend wandern sie über afferente Lymphgefäße zu den mesenterialen Lymphknoten (MLN) und gelangen über den Ductus thoracicus in den Blutkreislauf. Nach der Zirkulation durch den Organismus migrieren sie über Homing-Prozesse zurück in die Lamina propria oder direkt in die Epithelzellschicht [6]. Dieser Prozess wird über Adhäsionsmoleküle wie Integrine und Selektine, welche auf Oberflächen von Immunzellen und Endothelzellen exprimiert werden, gesteuert [7].

Die Differenzierung zur Plasmazelle geht insbesondere mit der Produktion und Sekretion von Immunglobulin A (sIgA) einher, was 80 % der Ig-Gesamtproduktion ausmacht [8]. Der überwiegende Anteil von sIgA wird wesentlich durch Zytokin transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)-produzierende dendritische-, Epithel- und T-Zellen induziert [9, 6].

Naive T-Lymphozyten werden hinsichtlich ihrer Oberflächenmoleküle in Cluster of Differentiation (CD) 4^+ T-Helferzellen und in CD 8^+ zytotoxische T-Zellen unterschieden. In Abhängigkeit des exprimierten T-Zell-Rezeptors wird dieser weiterhin in α/β - oder γ/δ -T-Lymphozyten unterteilt. Die α/β -T-Lymphozyten stellen 90 % der Gesamt-T-Zell-Population dar, während die γ/δ -T-Lymphozyten verstärkt im Darm angesiedelt sind [10]. Die Aktivierung der naiven T-Lymphozyten erfolgt durch prozessierte Antigene, welche über Haupthistokompatibilitäts-Moleküle (MHC) der Klasse I oder II auf APCs präsentiert werden.

Dabei interagiert das MHC-I-Molekül mit CD-8-T-Lymphozyten während das MHC-II Molekül von CD4-T-Lymphozyten erkannt wird. Eine Ausnahme bilden die γ/δ -T-Lymphozyten, welche MHC-unabhängig aktiviert werden [11].

Nach der Stimulation verlassen die Lymphozyten den Ort der Induktion über Lymphgefäße und gelangen ebenso wie die B-Lymphozyten über den Ductus thoracicus in den Blutkreislauf. Nach der Zirkulation durch den Organismus migrieren die T-Lymphozyten über die Expression von darmspezifischen Adhäsionsmolekülen wie $\alpha 4\beta 7$ -Integrin, CD103 und CCR9 zurück in die Lamina propria oder in das Epithel [7]. Am Effektorort können die T-Lymphozyten entweder diffus verteilt oder intraepithelial ihre spezifischen Funktionen ausführen [12, 13]. In Abhängigkeit des vorherrschenden Zytokinmilieus differenzieren die T-Lymphozyten entweder zu Effektor- oder zu regulatorischen Zellen. Effektorzellen der CD4-Subpopulation lassen sich aufgrund ihres Zytokinprofils in Th1-, Th2- und Th17-Zellen unterscheiden [14, 15, 16]. Th1-Zellen sind durch ein pro-inflammatorisches Zytokinprofil, wie IFN γ , TNF α und IL-12, gekennzeichnet, während Th2-Zellen vorrangig anti-inflammatorische Zytokine, wie IL-4 und IL-10 sezernieren [17]. Aufgrund des gegensätzlichen Zytokinprofils kann die Differenzierung der jeweils anderen Zelllinie gehemmt werden. Th17-Zellen produzieren vorrangig das pro-inflammatorische Zytokin IL-17 [18, 16]. Regulatorische Zellen der CD4-Subpopulation supprimieren die Aktivierung und Proliferation anderer T-Lymphozyten und können durch die Sekretion von IL-10 und TGF β regulierend auf das Gleichgewicht des GALTs einwirken [19, 20]. Aktivierte CD8⁺-Zellen differenzieren überwiegend zu zytotoxischen Effektorzellen und können direkt zytotoxische Substanzen sezernieren [21].

1.1.3 Das intestinale Epithel des Darms

Das einschichtige hochprismatische Darmepithel fungiert als erste Barriere, die first line of defence, zum Schutz des Organismus vor fremden Antigenen, pathogenen Mikroorganismen und deren Toxinen [22, 23]. Gleichzeitig wird der selektive Übertrag von Nährstoffen, Elektrolyten und Wasser vom Darmlumen in den Blutkreislauf ermöglicht [24, 25, 26]. Dieser Transport kann einerseits transzellulär direkt durch die Zelle, als auch parazellulär zwischen den Zellen hindurch erfolgen. Der Kontakt zwischen den einzelnen Epithelzellen wird durch Desmosomen, Adherens Junction (AJ), Gap Junctions (GJ) und Tight Junction (TJ) vermittelt. Dabei werden die Aufrechterhaltung der epithelialen Barriere und die parazelluläre Permeabilität maßgeblich durch die apikal lokalisierten TJ-Proteine bestimmt [27, 28]. Ebenso vermitteln TJ-Proteine die Polarität der Epithelzellen und gewährleisten den gerichteten Stofftransport [29]. Neben der epithelialen Barriere fungiert eine dem Epithel aufliegende Mukusschicht als zusätzliche mechanische Barriere und verhindert den direkten Kontakt zu luminalen Antigenen. Hauptbestandteile dieser Schicht sind neben Wasser filamentöse Glykoproteine, die Mucine. Anders als die membranständigen Mucine, die von den Epithelzellen gebildet werden, stellen insbesondere die von Becherzellen sezernierten

Mucine die schützende Schleimschicht über dem Epithel dar. Zwischen den Epithelzellen am Grund der Darmkrypte befindet sich eine weitere exokrine Drüsenform, die Paneth-Zelle. Diese sezernieren Lysozyme, Defensine und Phospholipasen ins Lumen, welche antimikrobiell wirken.

Das intestinale Epithel, der Mukus sowie antimikrobielle Peptide tragen neben dem hochentwickelten GALT ebenfalls zur Immunabwehr bei. Diese mechanische und chemische Barriere wird den unspezifischen Abwehrmechanismen zugeordnet. Neben der Barrierebildung sind intestinale Epithelzellen auch an immunologischen Prozessen beteiligt. Als sogenannte nicht-professionelle APCs können sie ebenso luminale Antigene transepithelial aufnehmen und naiven T-Lymphozyten mittels MHC-II präsentieren. Als Folge wird in den mukosalen T-Lymphozyten Anergie induziert, wenn keine weiteren Entzündungsmediatoren vorliegen [30]. Der Prozess der Anergie ist neben der Selektion autoreaktiver T-Lymphozyten im Thymus und der Präsenz regulatorischer T-Lymphozyten wichtiger Bestandteil der oralen Toleranz [31, 32, 33]. Dieser immunologische Mechanismus ist essentiell, um zu verhindern, dass der Organismus inflammatorische Reaktionen gegen Antigene der natürlichen Darmflora, der Nahrung und körpereigener Zellen aktiviert [34]. Ist dieser Mechanismus gestört, manifestieren sich Autoimmunerkrankungen, Nahrungsmittelallergien und chronisch entzündliche Darmerkrankungen [35, 36].

Unter physiologischen Bedingungen mit dauerhafter Antigenexposition der Darmschleimhaut sind neben den B- und T-Lymphozyten weitere immunkompetente Zellen wie Granulozyten, Mastzellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Makrophagen in der Lamina propria anwesend. Dabei besteht ein Gleichgewicht zwischen effektorischen und regulatorischen Immunzellen sowie pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen, was eine kontrollierte Immunantwort ermöglicht. Die andauernde Selektion durch das GALT hinsichtlich fremd und potentiell gefährlich sowie körpereigen und ungefährlich ist entscheidend für die nachfolgende Induktion einer inflammatorischen Immunantwort oder einer Immuntoleranz.

1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) sind rezidivierende oder konstante entzündliche Erkrankungen des Darms mit schweren, teils blutigen Durchfällen hoher Frequenz, Bauchschmerzen, Fieber und allgemeiner körperlicher Schwäche. Die Colitis Ulcerosa (CU) und der Morbus Crohn (MC) sind die zwei häufigsten Entitäten, welche sich hinsichtlich des Befallsmusters, der Art der Entzündung und des therapeutischen Vorgehens unterscheiden. Eine Sonderstellung nimmt die Colitis Indeterminata ein. Sie kann keiner der beiden Entitäten zugeordnet werden [37]. Einen Anstieg der CED Inzidenz wird seit etwa 1930 zunehmend in den Industriestaaten der nördlichen Hemisphäre verzeichnet [38]. In Deutschland leiden derzeit schätzungsweise 320.000 Patienten an einer CED. Die Inzidenz für CU beträgt 3,0 bis 3,9 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner, hinsichtlich MC bis zu 6,6 [39, 40]. Dabei ist eine geschlechterspezifische Präferenz nicht nachweisbar [41].

Die CED ist eine multifaktorielle Erkrankung, deren Ätiologie bislang noch nicht hinreichend geklärt wurde. Auslöser dieser Erkrankung ist eine komplexe Störung der epithelialen Barriere und einer Fehlregulation des mukosalen Immunsystems, bedingt durch exogene und endogene Faktoren wie genetische Prädisposition, Darmflora und Umweltfaktoren [42].

Der Einfluss genetischer Veränderungen wurde in verschiedenen Familien- und Zwillingsstudien belegt. Hier konnte eine familiäre Häufung, insbesondere bei Verwandten ersten Grades sowie bei eineiigen Zwillingen, nachgewiesen werden [43, 44, 45]. Ein Polymorphismus auf dem Chromosom 16 führt zur Veränderungen im „Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2“ (NOD2) bzw. „Caspase Recruitment Domain-containing protein 15“ (CARD15) und ist mit einem erhöhten MC-Risiko assoziiert [46]. Auch Mutationen der Gene Toll-like Rezeptor 4 (TLR4), Interleukin Rezeptor 23, Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT 3) und Human-Leukocyte-Antigen (HLA)–DR werden mit einer CED-Erkrankung assoziiert [47, 48, 49].

Die vorwiegende Lokalisation beider Entitäten in distalen Regionen des Gastrointestinaltraktes mit der höchsten bakteriellen Dichte lässt auf eine Beteiligung der intestinalen Darmflora schließen. So ist die Bakterienanzahl in einem entzündeten Kolon im Vergleich zu einem gesunden Darmabschnitt stark erhöht [50, 51]. Die Bedeutung der mikrobiellen intestinalen Flora bei der Entstehung von CED konnte besonders bei Untersuchungen in keimfreien oder gnotobiotischen Tiermodellen belegt werden, in denen es nicht zur Manifestation der Erkrankung kam [52, 53, 54]. Auch die Modulation der Darmflora hat einen Einfluss auf die CED-Pathogenese. So bewirkt der Einsatz von Antibiotika einen positiven Effekt auf die Behandlung von MC und CU [55, 56]. Ebenso kann die Therapie mit verschiedenen Probiotika zur Remissionserhaltung bei CU-Patienten beitragen und in Kombination mit konventioneller Therapie die aktive CU positiv beeinflussen [57, 58, 59, 60, 61].

Wie wichtig der frühkindliche Kontakt mit Umweltkeimen für die Entwicklung der oralen Toleranz ist, wurde bereits in den 80er Jahren von Strachan et al. postuliert [62]. Nach der sogenannten Hygienehypothese hat die geringere Exposition gegenüber Bakterien im ersten Lebensjahr einen entscheidenden Einfluss auf die postnatale Entwicklung des Immunsystems. Die Häufigkeit allergischer Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen und CED ist bei Stadtkindern, verglichen mit Kindern, die auf einem Bauernhof aufgewachsen sind, signifikant erhöht [63, 64, 65]. Dies belegen auch die steigenden Prävalenz- und Inzidenzzahlen für CED in den Entwicklungsländern [66, 67]. Ursache dieser Entwicklung ist die verminderte Konfrontation mit pathogenen Keimen und Parasiten im Kleinkindalter aufgrund verbesserter medizinischer Maßnahmen und Hygienestandards in diesen Ländern.

Weiterhin gilt als gesichert, dass Rauchen ein ätiologisch relevanter Faktor der CED ist, der sich bei CU und MC gegensätzlich auswirkt. Während Rauchen bei CU protektiv wirkt, ist es für den MC mit einer höheren Erkrankungswahrscheinlichkeit verbunden [68].

Weitere exogene Faktoren wie Stress oder psychiatrische Erkrankungen können die CED-Pathogenese ebenfalls negativ beeinflussen [69, 70].

1.2.1 Colitis Ulcerosa (CU)

Die CU ist vorwiegend im Mastdarm und Kolon lokalisiert. Die Entzündung breitet sich vom Mastdarm beginnend kontinuierlich nach proximal aus und ist auf die Mukosa und Submukosa beschränkt. Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch massive blutig-schleimig-eitrige Diarrhoen mit hoher Frequenz, begleitet von meist linksseitig lokalisierten kolikartigen Schmerzen [71]. Als Folge des andauernden Blut- und Nährstoffverlustes über den Darm treten Anämie und Gewichtsabnahme auf.

Die genaue Pathologie der CU ist bislang noch nicht vollständig aufgeklärt. Jedoch tragen der Verlust der epithelialen Integrität und eine gestörte Immunantwort wesentlich zum Entzündungsgeschehen bei.

Unter physiologischen Bedingungen bilden intestinale Epithelzellen und die darauf aufliegende Mukusschicht eine mechanische Barriere zwischen Lumen und GALT. Somit wird der parazelluläre und transzelluläre Stofftransport effizient reguliert und die Translokation von luminalen Antigenen über das Epithel unterbunden. Bei CU ist die intestinale Barriere gestört. Zum einen ist die schützende Mukusschicht bei CU-Patienten stark reduziert [72]. Zum anderen kann aufgrund der vorliegenden Entzündung die epitheliale Integrität nicht aufrecht erhalten werden. Dabei sind insbesondere die pro-inflammatorischen Zytokine TNF α und IFN γ an der Degeneration von TJ-Proteinen beteiligt [73]. Als Folge verlieren die Epithelzellen ihre Polarität und den Kontakt zueinander. Die daraus bedingte erhöhte intestinale Permeabilität ist ein Charakteristikum für CU und führt zur pathologischen Translokation von luminalen Bestandteilen. Nach heutigem Wissenstand kann nicht abschließend geklärt werden, ob der intestinale Barrierschaden, aufgrund eines primären Epithelzelldefekts entsteht oder sich als Folge der entzündlichen Prozesse manifestiert.

Durch den verstärkten Einstrom luminaler pathogener sowie nicht-pathogener Antigene kommt es zur erhöhten Aktivierung von APCs, welche dann wiederum die Differenzierung und Proliferation weiterer T-Lymphozyten induzieren. Unter physiologischen Bedingungen exprimieren DCs anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und TGF β , was vornehmlich die Differenzierung regulatorischer T-Lymphozyten induziert und somit supprimierend und regulierend auf die Immunantwort wirkt [74, 75]. Jedoch besitzen DCs auf ihrer Oberfläche neben den Pathogen-assoziierten Rezeptoren (zum Beispiel TLR) auch Rezeptoren für pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 β oder TNF α [76]. Steigt aufgrund des Barrierschadens oder einer intestinalen Entzündung die Konzentration von sogenannten „danger-signals“ wie Pathogene, Gewebeschäden oder pro-inflammatorische Zytokine, erhöhen die DCs die Anzahl kostimulierender Rezeptoren wie CD40, CD80 oder CD86 auf ihrer Oberfläche und verändern ihren Status vom ruhenden zum aktivierten Phänotyp.

Die nachfolgende Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) kann als Indikator angesehen werden, denn in Biopsien von CU-Patienten konnte eine erhöhte NF- κ B Aktivität nachgewiesen werden [77]. Der Transkriptionsfaktor übernimmt neben der CED auch in anderen Entzündungserkrankungen wie Rheumatoide Arthritis und Asthma eine zentrale Rolle [78]. Normalerweise liegt NF- κ B im Zytoplasma in einer inaktiven Form als Komplex mit den "inhibitors of κ B" (I κ B) vor. Dabei interagiert der Transkriptionsfaktor mit I κ B über die so genannte „ankyrin repeat domain“ (ARD), wobei I κ B als stöchiometrischer Inhibitor der DNA-Bindung fungiert [79]. Eine NF- κ B-Aktivierung führt zunächst zu einer Induktion der „inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase“ (IKK), welche I κ B an einem spezifischen NH₂-terminalen Serin phosphoryliert. Anschließend wird das phosphorylierte I κ B ubiquitinyliert und durch 26S Proteasomen abgebaut [80]. Als Resultat wird NF- κ B aus dem NF- κ B-I κ B-Komplex freigesetzt und transloziert in den Nukleus. Neben bakteriellen LPS können pro-inflammatorische Zytokine oder oxidativer Stress ebenfalls zur NF- κ B-Aktivierung beitragen. NF- κ B kommt ubiquitär vor und steuert die Expression einer Vielzahl von Zielgenen wie pro-inflammatorischer Zytokine, Chemokine, Oberflächen- und Zelladhäsionsmoleküle, die an zellulären Prozessen wie Immunantwort, Apoptose und Zellzyklus beteiligt sind [81]. Einige wichtige Mediatoren, welche auch in dieser Arbeit bestimmt wurden, sollen nachfolgend vorgestellt werden.

IL-6 als pro-inflammatorisches Zytokin wird von T-Lymphozyte, Makrophagen, Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen exprimiert [82, 83]. Die Bindung von IL-6 an seinen Rezeptor aktiviert den Signaltransduktionsfaktor STAT-3, in deren Folge anti-apoptotische Gene transkribiert werden [84]. IL-6 ist ebenso für die Rekrutierung weiterer Leukozyten in die intestinale Mukosa verantwortlich [85]. Des Weiteren ist IL-6 neben TGF β für die Differenzierung naiver CD4⁺-T-Lymphozyten in Th-17-Zellen notwendig [86, 87].

IL-10 wird von Th-2-Zellen, regulatorischen T-Lymphozyten, Makrophagen, DCs und Epithelzellen sezerniert. Als anti-inflammatorisches Zytokin inhibiert es die Sekretion von IL-1, IL-6 und TNF α durch Makrophagen und als Folge die Differenzierung naiver T-Lymphozyten in Th-1-Zellen [88]. Des Weiteren inhibiert es die Proliferation von APCs, Granulozyten und T-Lymphozyten und reduziert dadurch die fortschreitende Ausschüttung weiterer pro-inflammatorischer Zytokine [89].

IL-8, oder CXCL8 genannt, gehört zur Gruppe der Chemokine und wird von Phagozyten, Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen gebildet. Es wirkt stark aktivierend und chemotaktisch auf Neutrophile und fördert deren Adhäsion und Transmigration aus dem Endothel zum Entzündungsgeschehen, wo sie weitere pro-inflammatorische Mediatoren wie Zytokine oder reaktive Sauerstoffspezies sezernieren [90, 91]. Erhöhte Konzentrationen von IL-8 konnten im entzündetem Gewebe von CU-Patienten nachgewiesen werden [92].

MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), auch bekannt als CCL2, gehört zur Gruppe der Chemokine. Die erhöhte Sekretion dieser sogenannten „messenger“ Proteine durch

Gewebe- und Immunzellen bei inflammatorischen Prozessen führt zur einem chemotaktischen Gradienten [93]. Infolgedessen werden weitere Immunzellen wie Makrophagen und T-Lymphozyten aus vaskulären Strukturen rekrutiert und migrieren entlang des Konzentrationsgradienten in die entzündlichen Bereiche der Mukosa [94]. Die MCP-1-Konzentrationen in der Mukosa von UC-Patienten korrelieren dabei mit der Entzündungsaktivität [95, 96]. Wie wichtig MCP-1 für die Aufrechterhaltung einer Entzündung in der Darmmukosa ist, konnte in einer MCP-1-knock-out-Maus gezeigt werden. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen verlief eine experimentell-induzierte Kolitis milder, da weniger Makrophagen und T-Lymphozyten in die Mukosa einwanderten [97].

Nach der Stimulation der APCs, der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und der Sezernierung von pro-inflammatorischen Mediatoren erfolgt die Aktivierung und Differenzierung der T-Lymphozyten in die Subpopulationen CD4⁺ und CD8⁺ in Abhängigkeit vom vorherrschenden Zytokinmilieu. Ebenfalls am pathogenen Geschehen der CU sind die Th-17-Lymphozyten beteiligt, denn die intestinale Mukosa von UC-Patienten ist massiv mit TH-17-Zellen sowie deren assoziierten Zytokinen infiltriert [98, 99, 100]. Die Differenzierung CD4⁺-T-Lymphozyten in Th-17-Zellen wird durch die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 gesteuert [101, 102, 103]. Nach der Proliferation der Lymphozyten in den MLNs rezirkulieren sie über Homing-Prozesse in die Mukosa (siehe Kap. 1.1.2). Dabei binden die Adhäsionsmoleküle wie $\alpha 4\beta 7$ -Integrin von zirkulierenden T-Lymphozyten an den Rezeptor MAdCAM, deren Expression im entzündeten Darm erhöht ist [104]. Dies resultiert in einer erhöhten Aufnahme von darmspezifischen T-Lymphozyten [105]

Der erneute Zytokinausstoß dieser differenzierten T-Lymphozyten führt zur verstärkten und andauernden Aktivierung der T-Lymphozyten und resultiert in der charakteristischen Chronifizierung dieser Erkrankung. Dabei sind die stark entzündeten Bereiche im Darm besonders mit T-Lymphozyten infiltriert [106]. Regulationsprogramme des Immunsystems zur Verhinderung einer überschießenden Immunantwort wie Apoptose, Homing-Beschränkung und Suppression von T-Lymphozyten sind bei CED-Patienten gestört [107].

Neben den Subpopulationen, die pro-inflammatorische Effekte vermitteln, wirken regulatorische T-Lymphozyten und γ/δ -T-Lymphozyten immunregulierend auf die Entzündung. Durch die Sekretion der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF β , werden Makrophagen und andere T-Lymphozyten in ihrer Aktivität gehemmt und der Entzündungsprozess kann gebremst werden [108, 109]. Des Weiteren können sie durch die Produktion von Wachstumsfaktoren die epitheliale Regeneration fördern [110, 111]. Ihre genaue Funktion innerhalb der CU-Pathogenese ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Jedoch können funktionelle Störungen innerhalb dieser Subpopulationen zum Entzündungsgeschehen beitragen.

An der zellvermittelten Immunabwehr sind auch NK-Zellen beteiligt. Diese haben keine antigenspezifischen Rezeptoren und vermitteln zytotoxische Eigenschaften über die

Sekretion von Perforinen, Granzymen und Zytokinen. Auch diese Zellpopulation ist verstärkt in der Mukosa von CU-Patienten angesiedelt und sekretiert neben IL-4 vor allem IL-13, welches zur Zerstörung der intestinalen epithelialen Barriere beiträgt [112, 113].

Charakteristisch für die CU-Pathogenese ist die transendotheliale Migration zirkulierender Leukozyten aus vaskulären Strukturen in die Mukosa zum Entzündungsort aufgrund des vorherrschenden chemischen Gradienten. Die Ansammlung von neutrophilen Granulozyten im Kryptenlumen führt zu den sogenannten Kryptenabzessen. In Folge der transendothelialen Migration kommt es zu Veränderungen in der TJ-Protein-Expression, was in einer erhöhten intestinalen Permeabilität resultiert [114, 115]. Neben den Granulozyten sezernieren weitere Leukozyten wie Monozyten und Makrophagen pro-inflammatorische Mediatoren wie TNF α , IFN γ , reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Chemokine und Wachstumsfaktoren und tragen so zur Manifestation der Entzündung bei [116, 117].

Die Häufung von T-Lymphozyten und Leukozyten im entzündeten Gewebe resultiert in einem Ungleichgewicht zwischen regulatorischen und effektorischen Immunpopulationen. Die gesteigerte Interaktion dieser immunkompetenten Zellen, führt daraufhin zur erhöhten Freisetzung von Entzündungsmediatoren. Pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8, TNF α und IFN γ überwiegen, während anti-inflammatorische Zytokine wie IL-4 und IL-10 erniedrigt sind. Das Zytokinprofil bei CU mit erhöhten Konzentrationen von IL-5 und IL-13 deutet auf Eigenschaften einer Th-2-vermittelten Immunantwort hin [118, 119]. Jedoch wird das Th-2-Zytokin IL-4 nur wenig in der Mukosa exprimiert, während hohe Mengen des Th-1-Zytokins IFN γ in der Mukosa von CU-Patienten detektierbar sind [120]. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei CU nicht ausschließlich um eine Th-2-vermittelte Erkrankung handelt. Vielmehr sind, wie oben beschrieben, auch andere Subpopulationen wie Th-17- und Treg-Zellen sowie NK-Zellen an der Pathogenese und Chronifizierung beteiligt.

Die intestinale alkalische Phosphatase (iAP) ist ein Differenzierungsmarker von intestinalen Enterozyten und wichtiger defence-Faktor bei der mukosalen Abwehr. Die physiologische iAP-Aktivität korreliert mit der Epithelzell-Differenzierung und nimmt entlang des Krypt-Villus-Gradienten zu, während die Expression von proximal nach distal abnimmt [121]. Unter pathologischen Entzündungsprozessen während der CU ist die Enzymaktivität gestört. Die iAP mRNA-Expression ist bei CU-Patienten sowohl im entzündeten als auch im gesunden Darmgewebe signifikant vermindert im Vergleich zum Kontrollgewebe aus gesunden Patienten [122, 123]. Eine der wichtigsten Funktionen der iAP ist die Dephosphorylierung von Lipopolysacchariden (LPS). LPS ist ein Hauptbestandteil der äußeren Zellwand gram-negativer Bakterien, dessen Toxizität auf seinem diphosphorylierten Lipid-A-Motiv zurückzuführen ist, während die monophosphorylierte Form weniger toxisch ist [124, 125]. Die Fähigkeit der Dephosphorylierung von LPS *in vitro* und *in vivo* wurde 1997 zum ersten Mal beschrieben. Poelstra et al. konnten zeigen, dass LPS von *E.coli* bzw. *S.minnesota* durch die iAP-Aktivität in Ratten-Dünndarmschnitten dephosphoryliert wurde [126]. Bates et

al. konnte ebenfalls einen Toxizitätsverlust von LPS durch die Ko-Inkubation mit iAP nachweisen [127]. Das modifizierte LPS führte zu keiner Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen oder Mortalität bei Zebrafischen im Vergleich zum unmodifizierten LPS. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass das Enzym eine wichtige Rolle in der mukosalen Abwehr übernimmt. Durch die Fähigkeit zur Dephosphorylierung von LPS, welches permanent im Lumen vorliegt und das mukosale Immunsystem stimuliert, wird das Toxizitätspotential von LPS drastisch reduziert und die Induktion weiterer entzündungsspezifischer Signalwege über TLR4 unterbunden (Abb. 2). Die verminderte iAP-Expression bei CU führt zu einer erhöhten diphosphorylierten LPS-Konzentration im Lumen. Dieses kann aufgrund des CU-assoziierten Barrierschadens vermehrt über das Epithel translozieren, TLR4 pathologisch stimulieren und die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen fördern. Dagegen konnte in Kolitis-Tiermodellen gezeigt werden, dass die zusätzliche Applikation von iAP einen therapeutischen Effekt vermittelte [122, 128]. Auch in einer klinischen Studie konnte bei CU-Patienten durch die iAP-Gabe ein therapeutischer Erfolg erzielt werden [129].

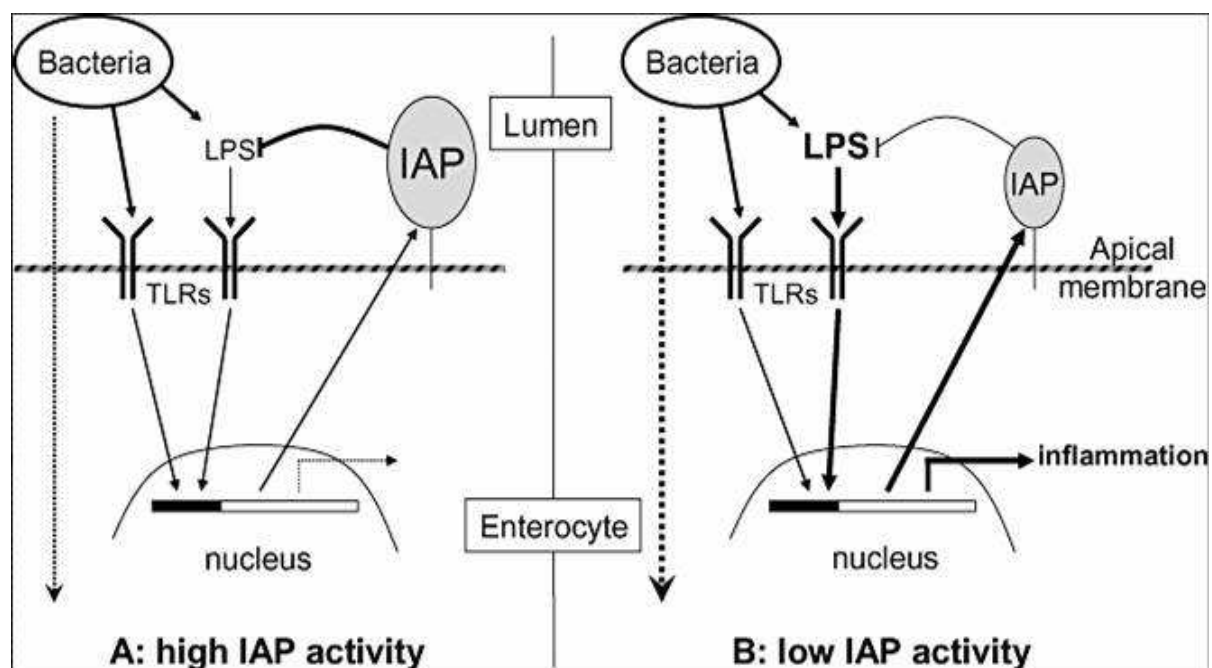


Abb. 2 Schematische Darstellung der Wirkungsweise von iAP nach Lallés et al. [1].

Zusammenfassend sind verschiedene Prozesse für das Krankheitsbild der CU verantwortlich. Der Verlust der epithelialen Integrität begünstigt die pathologische Translokation luminaler Antigene. Die daraus resultierende Häufung und Interaktion von effektorischen Immunpopulationen im Gewebe führt zu einem Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren. Auch der Verlust des defence-Faktors iAP begünstigt die Expression von pro-inflammatorischen Mediatoren. Das Zytokinprofil bei CU mit erhöhten Konzentrationen von pro-inflammatorischen Zytokinen und niedrigen Konzentrationen von anti-inflammatorischen Zytokinen in der Mukosa lässt sich weder einer Th-1- noch einer Th-2-vermittelten Immunantwort zuordnen [118, 119, 120]. Vielmehr sind auch andere Subpopulationen wie Th-17- und Treg-Zellen sowie NK-Zellen an der Pathogenese beteiligt. Weil regulatorisch wirkende Immunpopulationen den dysregulierten Zytokinsturm nicht unterbrechen können, wird die intestinale Barriere weiter geschwächt und werden mehr Immunzellen rekrutiert. Weitere Gewebeschäden manifestieren sich und die Chronifizierung der Entzündung schreitet voran. Somit besteht das Ziel jeder CU-Therapie darin, diesen Entzündungsprozess zu unterbrechen und eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten regulierender Immunpopulationen und anti-inflammatorischer Mediatoren zu erreichen.

1.3 Therapieansätze in der UC

1.3.1 Konventionelle Strategien

Primärziel der CU-Therapie ist die Remissionsinduktion und im weiteren Verlauf die Remissionserhaltung. Dabei stellen die Aminosalicylate und Kortikosteroide die zwei wichtigsten Substanzklassen dar, welche bei der konventionellen Therapie zum Einsatz kommen.

Sulfasalazin und Mesalazin sind die wichtigsten Therapeutika der Aminosalicylate-Medikamentengruppe und enthalten die antientzündliche Komponente 5-Aminosalicylsäure (5-ASA). Als genauer Wirkmechanismus werden die Hemmung der Prostaglandin- und Leukotrinsynthese, die Inhibition der NF- κ B-Aktivierung und die Entfernung reaktiver Metabolite diskutiert [130, 42]. Die Applikation oral und/oder rektal erfolgt abhängig von der Lokalisation der Entzündung und deren Aktivität. In der Regel wird die 5-ASA-Gabe in Form von Klistieren und Rektalschäumen als Akuttherapie bei gering- bis mäßiggradiger CU angewendet [131, 132]. Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählen Übelkeit, Müdigkeit, Bauchschmerzen und Schwindel sowie in seltenen Fällen auch Allergien [133].

Cortison, Glukokortikoide und Steroide sind Therapeutika der Kortikosteroide. Diese Substanzklasse wirkt sowohl antientzündlich als auch immunsuppressiv durch Inhibition der T-Zellaktivierung und Zytokinsekretion [134]. Eine moderate bis hochgradig aktive CU sowie 5-ASA-Therapieversager werden mit Kortikosteroiden oral oder intravenös (i.v.) behandelt [134, 42]. Häufige Nebenwirkungen sind Osteoporose, Diabetes mellitus, Bluthochdruck oder

Niereninsuffizienz [135, 136]. Trotz ihrer schnellen Wirkung und hohen Effektivität zeigt nur jeder zweite CU-Patient ein dauerhaftes Ansprechen auf die Steroid-Therapie [137]. Auch das Risiko der Steroidabhängigkeit ist für CU-Patienten bereits nach einjähriger Behandlung stark erhöht [138]. Somit sind die Kortikosteroide zur Erhaltungstherapie nicht geeignet.

Weitere Therapieoptionen sind Biologika wie Infliximab oder Adalimumab. Diese monoklonalen Antikörper binden das pro-inflammatorische Zytokin TNF α und induzieren Apoptose in immunologischen T-Lymphozyten [139, 140, 141]. Sie werden bei therapierefraktären Patienten sowie bei einem schweren Krankheitsverlauf eingesetzt [142].

Nach Remissionsinduktion wird durch Erhaltungstherapie der Remissionserhalt angestrebt. Dabei werden vorrangig 5-ASA-Präparate oder bei therapierefraktären Patienten Biologika mit niedriger Dosierung eingesetzt. Die klinische Remission definiert sich über folgende Kriterien: nicht mehr als drei Stühle pro Tag, kein sichtbares Blut im Stuhl sowie keine intestinalen und extraintestinalen Beschwerden. Sind diese Kriterien erfüllt, kann ein Auslassversuch unternommen werden.

1.3.2 Alternative Strategien

Alternative Therapiestrategien sollten in einem akuten Schub nicht angewendet werden. Erst wenn durch die konventionelle Behandlung eine Remission erreicht wird, können zu einer Remissionserhaltung alternative Strategien, wie die Anwendung von Probiotika verwendet werden.

Die Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) und die World Health Organisation (WHO) definieren Probiotika als lebende Mikroorganismen, die, wenn in ausreichender Menge verabreicht, dem Wirtsorganismus einen gesundheitlichen Nutzen bringen. Für Probiotika werden diverse therapeutische Effekte bei CED diskutiert. So können durch kompetitive Verdrängung pathogene Bakterien am Anhaften an intestinalen Epithelzellen gehindert sowie bereits adhärenente Pathogene wieder von den Epithelzellen gelöst werden [143]. Neben der Produktion von antimikrobiellen Substanzen wie Essig-, Milch- oder Propionsäure sind sie auch in der Lage, die Expression von Defensinen in intestinalen Epithelzellen zu induzieren [143, 144]. Defensine besitzen antimikrobielle Eigenschaften, werden von den Epithelzellen exprimiert und sind wichtige Bestandteile des Mukus [145, 146]. Die Pathogenese der CED geht einher mit einer Reduktion der Defensin-Produktion [147]. Des Weiteren können Probiotika barriestabilisierende Effekte durch die Veränderung der TJ-Protein-Expression vermitteln sowie Einfluss auf antigenpräsentierende Zellen und damit das Zytokin-Milieu nehmen [148].

Das Probiotikum *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) ist ein gramnegatives, stäbchenförmiges Bakterium aus der Familie der Enterobacteriaceae. Es wurde 1917 vom Mikrobiologen Alfred Nissle erstmalig aus dem Stuhl eines Soldaten, welcher nicht an der Shigellenruhr erkrankte, isoliert [149]. Nissle kultivierte diesen Organismus, charakterisierte ihn, überführte die

Kulturen in Gelatinekapseln und vermarktete dieses Produkt unter dem Namen Mutaflor®. Die Sequenzierung des Genoms von EcN zeigte, dass, im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der Gattung *Escherichia*, Virulenzfaktoren wie das porenbildende α -Hämolysin oder das Adhäsin P-Fimbrien nicht vorhanden sind [150]. Vielmehr verfügt dieses Probiotikum über verschiedene „Fitness-Faktoren“ wie Proteasen, Adhäsine oder Eisenaufnahmesysteme, die einen Überlebensvorteil gegenüber anderen pathogenen- sowie nicht-pathogenen *E.coli*-Stämmen darstellen [151, 152].

Diverse *in vitro*-Studien konnten für EcN immunmodulatorische Effekte einerseits und barrierestärkende Effekte andererseits nachweisen [153, 154, 155, 156]. Wehkamp et al. zeigten, dass EcN die humane β -Defensin-2 Expression *in vitro* und *in vivo* stimuliert [157]. Des Weiteren wurde in diversen Infektionsmodellen gezeigt, dass EcN die Adhäsion und Invasion potentiell pathogener Bakterien wie *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri* oder *Listeria pneumophila* unterbinden kann [158]. Die aufgelisteten Arbeiten zeigen, dass EcN über ein vielfältiges Wirkungsspektrum wie anti-inflammatorische und barrierestärkende Effekte verfügt. Ein wichtiges Kriterium eines Probiotikums, das Überleben der Magen-Darm-Passage nach enteraler Aufnahme, wurde für EcN in Mensch und Tier bewiesen [159, 160]. Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, dass EcN einen protektiven Effekt im DSS-Kolitis-Tiermodell vermittelt [154, 155, 161, 162]. So kam es in den behandelten Gruppen zu einem geringeren Gewichtsverlust und einer verminderten Kolonverkürzung. Ebenfalls war die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen im Gewebe reduziert. Wie bereits *in vitro* nachgewiesen, konnte auch *in vivo* ein barrierestärkender Effekt durch die Therapie mit EcN erzielt werden. Das therapeutische Potential von EcN konnte auch in mehreren doppelblind placebokontrollierten Studien mit CU-Patienten nachgewiesen werden. In einer Studie wurden 120 CU-Patienten in Remission in zwei Gruppen randomisiert und erhielten über 12 Wochen entweder die Standardmedikation zur Remissionserhaltung Mesalazin oder EcN [58]. Die Rückfallrate für Mesalazin lag bei 11,3 % versus 16 % für EcN. Die Verträglichkeit der Medikation war in beiden Gruppen gleich gut. In einer anderen Studie wurden 327 CU-Patienten in Remission eingeschlossen, welche Mesalazin oder EcN über einen Zeitraum von 12 Monaten erhielten [57]. Anschließend wurde der Darmtrakt sowohl endoskopisch als auch histologisch bezüglich der Krankheits-Aktivität beurteilt. Die Rückfallrate bei Mesalazin betrug 33,9 % versus 36,4 % bei EcN. Es zeigten sich bei beiden Therapiegruppen keine Unterschiede, weder in der Histologie noch im endoskopischen Index. EcN war auch in dieser Studie genauso effizient bei der Prävention von Rückfällen und nicht benachteiligt gegenüber der Standardmedikation Mesalazin. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich für EcN auch bei der Behandlung von Patienten mit aktiver CU [60]. Die Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) empfiehlt in ihren Leitlinien EcN als Alternative zur Standardmedikation Mesalazin bei einer remissionserhaltenden Therapie von CU-Patienten, wenn eine Unverträglichkeit gegenüber Aminosalicylaten besteht [39].

Ein weiteres Probiotikum ist das bakterielle Mischpräparat VSL# 3, das aus vier *Lactobacillus*-Stämmen, drei *Bifidobakterien*-Stämmen und einem *Streptococcus*-Stamm besteht. In den Leitlinien der DGVS wird VSL# 3 ebenfalls als alternative Medikation zur Remissionserhaltung bei Kindern empfohlen [39].

1.4 Chemisch induzierte Tiermodelle für die CU

Die CU stellt eine multifaktorielle Erkrankung dar und basiert auf komplexen Interaktionen zwischen verschiedenen Zellpopulationen. Diese Komplexität kann bis zum heutigen Tage nicht in zellulären Modellen dargestellt werden. Aus diesem Grund sind tierexperimentelle Modelle zur Erforschung der CU-Pathogenese und zur Untersuchung der therapeutischen Wirksamkeit von Substanzen erforderlich. In der Literatur ist eine Vielzahl solcher Modelle, die sich im Wesentlichen in der verwendeten Spezies und der krankheitsauslösenden Substanz unterscheiden, beschrieben. Neben chemisch induzierten Kolitis-Modellen finden auch genetische und immunologische Modelle ihren Einsatz in der CU-Forschung. Die Induktion einer Kolitis durch die Applikation von chemischen Substanzen zählt aufgrund der guten Reproduzierbarkeit und der einfachen Handhabung zu den am häufigsten verwendeten Modellen.

1.4.1 Natriumdextransulfat (DSS)

Die Verwendung von Natriumdextransulfat (DSS) zur Induktion einer akuten Kolitis in der Maus wurde 1990 erstmalig von Okayasu et al. beschrieben [163]. Die intestinale Entzündung wird dabei durch die zyklische Verabreichung von im Trinkwasser gelösten DSS (MG: 36-50 kDa) induziert und ähnelt im klinischen und histologischen Bild der humanen Kolitis. Die Applikation des DSS im experimentellen Ansatz hinsichtlich Konzentration (3 – 7 %) und Dauer (5 – 7 Tage) hat einen wesentlichen Einfluss auf Ausprägung und Lokalisation der Entzündung [164, 165].

Das DSS vermittelt dabei einen direkten toxischen Effekt auf die Epithelzellschicht des Kolons und verursacht Defekte in der Epithelzellbarriere [166]. Dieser fortschreitende Verlust der regelmäßigen Kryptenarchitektur zählt zu den frühen histologischen Veränderungen in der DSS-Kolitis. Der initiale Epithelzellschaden ist durch eine gesteigerte Permeabilität gekennzeichnet und ermöglicht die Penetration von luminalen Antigenen und Mikroorganismen in die Mukosa. Die darauffolgende erhöhte Stimulation des gastrointestinalen Immunsystems ist als sekundärer Prozess in der DSS-Kolitis anzusehen. Histologisch zeigen sich in Darmpräparaten eine massive Infiltration von Neutrophilen, eine epitheliale Degeneration, Nekrosen und Kryptenabzesse [167, 168].

Das DSS findet auch Verwendung bei der Induktion einer chronischen Kolitis. Hierbei kommt es zur DSS-Applikation über mehrere Zyklen, unterbrochen von DSS-freien Zyklen mit Wasser. Die chronische Entzündung spiegelt sich in der Entstehung von epithelialen

Dysplasien wider und ähnelt den klinisch beobachteten Rekurrenz-Remissions-Phasen der CU [163].

1.4.2 Trinitrobenzoesulfonsäure (TNBS)

Die Verwendung von 2,4,6-Trinitrobenzoesulfonsäure (TNBS) zur Induktion einer akuten Kolitis in Ratten wurde erstmalig 1989 von Morris et al. beschrieben [169]. Das heute üblichere Modell der TNBS-Kolitis in Mäusen etablierten Neurath et al. 1995 [170]. TNBS als haptenisierendes Reagenz, gelöst in Ethanol, führt nach rektaler Instillation zu einer Th-1-vermittelten Immunantwort im Darm mit den damit assoziierten Zytokinen TNF- α und IFN- γ . Dabei verursacht das mitgeführte Ethanol, ähnlich wie das DSS, primär einen direkten Epithelzellschaden und ermöglicht im Anschluss die verbesserte Penetration von TNBS in die tieferen Darmschichten. Histologisch zeigen sich eine transmural ausgeprägte Entzündung mit verdickter Schleimhaut, entzündliche Infiltrationen von Makrophagen und T-Zellen sowie Ödeme und Ulzerationen [171, 172].

1.4.3 2-Iodacetamid (IA)

Der Sulfhydryl-Blocker 2-Iodacetamid (IA), eine chemische Verbindung aus der Acetamid-Gruppe, ist in der Lage, SH-Gruppen in der Aminosäure Cystein irreversibel zu alkylieren. Die Verwendung von IA in einem tierexperimentellen Modell wurde 1997 von zwei Arbeitsgruppen beschrieben. Rachmilewitz et al. applizierte 2 % IA intrajejunal, während Satoh et al. 0,3-10 % IA intrarektal verabreichten [173, 174].

Der IA-induzierte mukosale Schaden zeichnete sich im Gegensatz zur DSS und TNBS durch eine rasche Entwicklung von mukosalen Ödemen, Erosionen und Ulzerationen innerhalb weniger Stunden im betroffenen Darm aus. Histologisch zeigt sich eine starke Infiltration von Neutrophilen bis in die Submukosa, Nekrosen und Ulzerationen [175, 176].

Ähnlich wie DSS und TNBS kann die Schwere der induzierten Kolitis durch Variationen in der IA-Konzentration und dem verabreichten Volumen beeinflusst werden. Die Verwendung von 1 % Methylcellulose als Trägerreagenz gewährleistet dabei eine gleichmäßige Verteilung und die Entstehung von mukosalen Läsionen im betroffenen Darm.

1.4.4 *In situ*-Perfusion

Zur Untersuchung pharmakologischer und toxikologischer Wirkungsweisen von Substanzen werden vielfach *in vitro*-Perfusionsmodelle eingesetzt [177, 178, 179]. Die isolierte *in vitro*-Organperfusion ist besonders in der Transplantationsmedizin von Bedeutung. Hier können Ischämie- und Reperfusions-Schäden zum partiellen Verlust der Transplantat-Funktion führen [180]. Aus diesem Grund werden Entwicklungen von Konservierungslösungen und Substanzen zur Verminderung dieser Problematik vorab in isolierten Organen getestet [181, 182].

Die *in vitro*-Perfusion eines Darmsegmentes wurde erstmalig 1954 beschrieben [183]. Bei dem sogenannten „everted-sacs“-Modell werden Dünndarmsegmente umgestülpt, so dass die Mukosa auf der Außenseite erscheint, mit Nährlösung und Sauerstoff befüllt und an den Enden ligiert. Anschließend wird das Dünndarm-Segment in Puffer, in welchem die Testsubstanz gelöst ist, überführt. Die außenliegende Mukosa hat großflächigen Kontakt zur Testlösung und es können Aufnahmemechanismen und Wirkung von Noxen, Arzneimitteln und Functional Food untersucht werden [184, 185, 186].

1967 wurde erstmalig die *in vivo*-Perfusion an isolierten Jejunumsegmenten der Ratte beschrieben [187]. Bei dem „Gut-loop“-Modell wird ein Dünndarmabschnitt unter Aufrechterhaltung der zu- und abführenden Gefäße für Resorptionsstudien verwendet. Der Vorteil dieser Methode ist die weiterführende Versorgung des Segments über den körpereigenen Blutkreislauf des Versuchstieres. Nachdem das Segment vom Darm proximal und distal getrennt wird, können die offenen Enden zu einem Ring anastomosiert (Closed loop-Technik) oder in ein Leitungssystem integriert werden (Openloop-Technik). Anschließend wird das Darmsegment mit in Flüssigkeit gelöster Testsubstanz gefüllt oder perfundiert. Vorteil dieser Methode ist, dass neben dem Darminhalt auch das venös abfließende Blut hinsichtlich der resorbierten Testsubstanz untersucht werden kann. Dieses Modell wird neben pharmakologischen Studien auch in der Transplantat- und Sepsismedizin verwendet [188, 189, 190, 191, 192].

Die Resorption bestimmter Stoffe kann auch direkt am Menschen mit der Ballon-Methode getestet werden [193, 194]. Hierbei wird ein Darmsegment nach proximal und distal durch zwei leere Ballons isoliert und kann mit einer in Flüssigkeit gelösten Testsubstanz gefüllt werden. Anschließend wird die Flüssigkeit wieder abgesaugt und die resorbierte Menge kann anhand der Konzentrationsdifferenz bestimmt werden [195].

Die beschriebene *in situ*-Perfusion von Organen unter *in vivo*-Bedingungen bezieht den Gesamtorganismus mit seinem systemischen Kreislauf und vegetativen Nervensystem sowie deren vielfältige Interaktion von Blut und dessen korpuskulären Bestandteilen mit dem mikrovaskulären Gefäßbett ein. Somit gewährleistet dieses Perfusionsmodell in hohem Grad physiologische Bedingungen.

1.5 Mineral-Silikate

Der heutige Einsatz von Tonmineralien in der Humanmedizin ist auf ihre lange Historie zurückzuführen. Bereits die Ägypter nutzten 3000 v. Chr. die positiven Eigenschaften der Tonerden am Nilufer bei äußeren Anwendungen wie kosmetischen Masken oder antiseptisch wirkenden Schlamm-bädern. In der Antike verordnete Hippokrates 400 v. Chr. Tonmineralien zur inneren Anwendung. Der griechische Arzt Pedanios Dioskurides empfahl verschiedene Tonmineralien zur innerlichen und äußerlichen Anwendung in seiner Arzneimittellehre. Auch in medizinischen Lehrbüchern des Mittelalters und der frühen Neuzeit werden

Tonmineralien zur äußeren Anwendung bei Wundheilung oder innerlichen Anwendung bei Magen-Darm-Erkrankungen aufgeführt. Die medizinische Wirkung von Tonmineralien basiert dabei auf physikalisch-chemischen Effekten, welche jedoch unterschiedlich stark in den einzelnen Silikat-Klassen ausgeprägt sind.

1.5.1 Eigenschaften von Mineralsilikaten

Silikate sind gesteinsbildende Minerale und mit etwa 75 % am Massenaufbau der Erde beteiligt. Grundbaustein von Silikatstrukturen sind SiO_4^- -Tetraeder. Je nach Anordnung dieser Tetraeder untereinander in Gruppen, Ringen, Schichten und Gerüsten lassen sich die Silikate in verschiedene Unterklassen einteilen. Die Tonminerale gehören zu den Schichtsilikaten, deren Grundbausteinen SiO_4^- -Tetraeder und $[\text{Al}(\text{OH})_6]^-$ oder $[\text{Mg}(\text{OH})_6]^-$ -Oktaeder sind. Die Vielfalt der Tonminerale ergibt sich durch die Verknüpfungen der einzelnen Tetraeder- und Oktaeder-Schichten in unterschiedlicher Reihenfolge. Folgt eine Tetraeder- auf eine Oktaeder-Schicht, ergeben mehrere dieser übereinander geschichteten Moleküle ein Zweischicht-Tonmineral wie zum Beispiel Kaolin. Tonminerale dieser Klasse sind aufgrund ihres ausgeglichenen Ladungspotentials nicht quellfähig. Bei Dreischicht-Tonmineralien wie Illit, Montmorillonit und Smektit ist eine Oktaeder-Schicht umgeben von zwei Tetraeder-Schichten. Zwischen den einzelnen Dreierschichten kann Wasser aufgenommen werden. Des Weiteren befinden sich austauschbare Kationen zum Ladungsausgleich zwischen den Dreierschichten. Vierschicht-Tonminerale wie Chlorit bestehen aus zwei Tetraeder- und zwei Oktaeder-Schichten. Sie weisen dieselben Eigenschaften wie Zweischicht-Tonminerale auf. Die Kombination von Zwei- und Dreischicht-Tonmineralien wird Wechsellagerungsmineral genannt. Neben Kaolinit/Smektit, Chlorit/Vermikulit treten besonders häufig Wechsellagerung von Illit/Smektit oder Illit/Montmorillonit auf. Diese Verbindungen zeichnen sich, im Vergleich zu reinen Montmorilloniten, durch vielfältigere Austauschreaktionen von Kationen und Anionen aus.

1.5.2 Verwendung in der Humanmedizin

Es gibt verschiedene Silikat-Klassen, die sich hinsichtlich der Expansionsfähigkeit ihrer Schichten, der Interlayer-Konditionen und Bindungsstärken sowie in ihrer Ionenaustauschkapazität, Quellfähigkeit und in ihren spezifischen Oberflächen unterscheiden. Besonders Tonminerale der Dreischicht-Klasse und die Wechsellagerungsminerale werden aufgrund ihrer hohen Quellfähigkeit und der Ionenaustauschkapazität zu kosmetischen und therapeutischen Zwecken eingesetzt. In der Humanmedizin ist besonders die gute Wirksamkeit und Verträglichkeit bei Durchfall-Erkrankungen beschrieben. So zeigten mehrere klinische Studien, dass Kleinkinder mit akuter, wässriger Diarrhoe in den Smektit-behandelten Gruppen signifikant geringere Stuhlmengen und eine kürzere Erkrankungsdauer hatten, verglichen mit Placebo-Gruppen [196, 197, 198]. Die Behandlung von akuter Diarrhoe bei Erwachsenen mit Smektiten führte ebenfalls zu einer signifikant verkürzten Erkrankungsdauer [199]. Auch wenn diese klinischen Studien nicht in Europa

durchgeführt wurden, zeigen sie dennoch, dass die zusätzliche Gabe von Smektiten neben dem Standard Rehydrierungsprotokoll positive, therapeutische Effekte bei der Behandlung von akutem, wässrigem Durchfall vermittelten. Die Organisation „European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for Pediatric Infectious Diseases“ hat die Intervention mit Smektiten in ihren Leitlinien zur Behandlung akuter Gastroenteritis bei Kindern aufgenommen [200]. Neben der Behandlung von Durchfallerkrankungen konnten auch positive Effekte auf die Refluxerkrankung nachgewiesen werden [201].

Bei allen durchgeführten klinischen Studien zeichneten sich die eingesetzten Smektite durch eine gute Verträglichkeit aus, unerwünschte Nebenwirkungen traten nicht auf. In weiteren Tierversuchsstudien zur CED konnte ein anti-inflammatorisches Potential der Smektite nachgewiesen werden. In einem TNBS-Kolitis-Modell reduzierte sich die induzierte Entzündung im Kolon signifikant unter der Therapie mit einem Wechsellagerungsmineral [202, 203].

In weiteren *in vitro*-Versuchen vermittelten Silikate einen therapeutischen Effekt auf die Barriere von TNF α -stimulierten Epithelzellen [204]. Auch die LPS-induzierte IL-8- und IL-1 β -Sekretion von humanen Epithelzellen und Monozyten konnte durch die Therapie mit Wechsellagerungsmineralien reduziert werden [203].

1.5.3 Friedländer Mineralsilikate

Das Friedländer Silikat ist ein Ton mariner Genese. Es ist eine natürliche Mischung aus verschiedenen Tonmineralien und gehört zur Klasse der Wechsellagerungsmineralien. Den Hauptbestandteil bildet das Na-Montmorillonit/Illit Wechsellagerungsmineral mit 50-60 %. Die Minerale Kaolinit/Chlorit und Muskovit sind mit 20 % vertreten und funktionslose Nichttonmineralien wie Quarz und Feldspat haben einen Anteil von 20 %. Die Besonderheit des Friedländer Silikats ist das hohe Wasseraufnahmevermögen. Gleichzeitig können die in den einzelnen Zwischenschichten vorhandenen Ionen leicht gegen anorganische und organische Moleküle reversibel ausgetauscht werden. So ergeben sich durch den isomorphen Ersatz von Aluminium durch Fe²⁺-, Fe³⁺- und Mg²⁺- und Si-Ionen an den Flächen und Bruchkanten Bindungsstellen sowohl für Kationen als auch Anionen. Des Weiteren zeichnet sich das Silikat durch physikalische und chemische Adsorption, Ionenaustauschkapazität, Thixotropie, Quellvermögen und einem hohen Anteil anionischer Elektrolyte aus. Ein weiteres Alleinstellungsmerkmal des Friedländer Silikats ist ein relativer Überschuss von Fe²⁺ gegenüber Fe³⁺ in der mineralischen Matrix, welcher eine hohe Adsorptionskapazität für Sauerstoffanionen und andere Toxine bedingt. All diese verschiedenen positiven Eigenschaften sind zurückzuführen auf das Wechsellagerungsmineral. In einer Studie der Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe konnte auch nachgewiesen werden, dass Friedländer Silikate gegenüber anderen Silikaten nur geringe Mengen von Aluminiumionen freisetzen [205]. Ursache hierfür ist der

hohe Anteil von Illiten in der Wechsellagerung, was gleichbedeutend mit einem sehr geringen Anteil von austauschbaren Aluminiumionen ist und die Nutzung der Friedländer Silikate für gesundheitliche Zwecke ermöglicht. In der humanen Praxis wird das Silikat zum Beispiel zur Linderung von Durchfall- und Refluxerkrankungen eingesetzt, aber auch zur kurativen Begleitung und Unterstützung einer Darmsanierung. Ein großes Einsatzgebiet der Friedländer Silikate ist die Futtermittelindustrie. Hier zeigten mehrere Studien, dass das Silikat als Futtermitteladditiv außerordentlich gut schädliche Toxine bindet [206, 207].

Das Friedländer Dreischicht-Silikat vereint viele unterschiedliche Eigenschaften, die für Mensch und Tier von Bedeutung sind und weist dabei geringe bis keine bekannten Nebenwirkungen auf. Um die Bindekapazität des Wechsellagerungsminerals zu steigern, wurde das Rohmaterial weiter zerkleinert, was die Anzahl der Bruchkanten erhöht und nichtquellfähige Bestandteile wie Quarz abreichert. Dabei entstanden neben dem Ausgangsprodukt mit einer Teilchengröße von $< 15 \mu\text{m}$, weitere Produkte mit einer Teilchengröße von $< 5 \mu\text{m}$ und von $< 2 \mu\text{m}$.

2 Zielstellung

Das schwerwiegende Krankheitsbild der CU, eine bis dato nicht hinreichend aufgeklärte Pathogenese und etablierte Therapieverfahren, die lediglich den Krankheitsprozess unterbrechen, aber nicht endgültig heilen, machen deutlich, dass an der Untersuchung zur CU-Pathogenese und an der Optimierung und Neuentwicklung von Therapien gearbeitet werden muss. Dafür werden experimentelle Modelle benötigt, welche die Pathogenese abbilden und die Testung und Evaluierung neuer Therapieoptionen ermöglichen.

Dazu sollte in dieser Arbeit ein Kurzzeitschädigungsmodell als Versuchs- und Testsystem etabliert werden, um einerseits die frühe Pathogenese von CU-Erkrankungen studieren und andererseits neue Therapieoptionen evaluieren zu können. Es wurden folgende Ziele für die Etablierung definiert:

1. In einem Rattenmodell sollte eine reproduzierbare mukosale Entzündung mithilfe der *in situ*-Perfusion induziert werden, deren Merkmale der humanen CU und der tierexperimentellen Kolitiden möglichst nahe kommen sollte.
2. Im Kurzzeitschädigungsmodell sollte dann die Wirksamkeit der klinisch etablierten CU-Therapeutika Dexamethason und Mutaflor auf die induzierte mukosale Entzündung verifiziert werden.
3. Im etablierten Kurzzeitschädigungsmodell sollte anschließend die Wirksamkeit eines Silikats (Resormin) als neuartige Therapieoption für intestinale Entzündungen untersucht werden.
4. Schließlich sollten mittels zellulärer Modelle die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der Wirkung von Resormin und zwei weiterer Silikate auf die mukosale Entzündung analysiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte, Labormaterialien, Chemikalien und Reagenzien

3.1.1 Geräte

Name	Firma
Blockzykler "PTC-200"	Biozym
Blotter	Biometra
CO ₂ -Brutschrank	CB210, Binder
Elektrophoreskammer DNA Sub cell	BioRad
ELISA-Reader "anthos htIII"	Mikrosysteme GmbH
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Fein Optik Jena
Geldock E.A.S.Y.	Herolab
Handstückzähler	Roth
Heizblock	Haep Lbor Consult
Heizplatte	UniEquip
Laminarbox Herasafe	Heraeus
Magnetrührer	UniEquip
Mikroskop Telaval 31	Zeiss
Mikrowelle Alaska 900	
NanoDrop 1000	Thermo Scientific
OP-Tisch Heizplatte	K. Effenberger Med.-Techn. Geräte
pH-Meter	Uni Equip
Pipetten	Eppendorf
Pumpe	Pharmacia
Schüttler „WT16“	Biometra
Spektrophotometer „ND-1000“	Peqlab
Steuergerät für OP-Tisch	K. Effenberger Med.-Techn. Geräte
Stromgerät „Power Pack 25T“	Biometra

Stromgerät „PowerPAC 1000“	BioRad
TissueRuptor	Quiagen
Ultraschallgerät „HD2070“	Bandelin Sonopuls
Voltohmessgerät	Merck Millipore
Vortexer	UniEquip
Waagen	Sartorius
Wasserbad	Julabo
Zentrifuge „Avanti 30 Centrifuge“	Beckman
Zentrifuge „Labofuge 400R“	Heraeus
Zentrifuge „Megafuge 1.0R“	Heraeus
Zentrifuge „Mikro 200“	Hettich

3.1.2 Labormaterialien

Name	Firma
3-Wege-Hahn „Discofix“	Braun
96well PCR Platte	Sarstedt
Chirurgisches Nahtmaterial	Resorba
Deckgläser	Menzel Gläser
Dermafil	S.M.I. AG
EDTA-Monovetten	Sarstedt
Einmal-Rasierer	Wilkinson
Einmal-Injektions-Kanüle	Braun
Einwegpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner
Elektrode (STX-2)	Merck Millipore
Gel-Blotting-Papier Whatmann 3MM	Roth
Immobilion-FL Transfer Membran	Millipore
Kauterisator	Aaron Medical

Klebefolie, optisch klar	Sarstedt
Kleinelumiger Schlauch	Portex
Kompressen	Hartmann
Kryoröhrchen (2 ml)	Biozym
Mikrotiterplatten (6-, 12-, 24-, 96-Wellplatten)	BD Falcon
Objektträger	Marienfeld
Pentobarbital	Zentralapotheke des Klinikums
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Safety-Kanüle für Monovetten	Sarstedt
Skalpells	Schreiber Instrumente
Spitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Greiner, Eppendorf
Spritzen (5 ml, 10 ml, 25 ml)	BD Discardit II
TissueRuptor Disposable Probes (nonsteril)	Quiagen
Transwell-Einsätze (12 well, 24 well)	BD Falcon
Transwell-Einsätze (24 well, 96 well)	Corning
Wattetupfer	Hartmann
Zellkulturflaschen (25 mm ² , 75 mm ²)	Cellstar
Zentrifugenröhrchen (14 ml, 15 ml, 50 ml)	Greiner

3.1.3 Chemikalien

Name	Firma
Acrylamid 40 %	BioRad
Agarose	Biozym
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich
Anti-Anti (antibiotic-Antimycotic 100x)	Gibco
Avidin/ Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories
BM Purple	Roche

Bovines Serumalbumin	
Chloroform minimum 99 %	Sigma-Aldrich
dATP Solution	Invitrogen
dCTP Solution	Invitrogen
Dexamethason	Sigma-Aldrich
dGTP Solution	Invitrogen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
dTTP Solution	Invitrogen
Dulbecco's MEM	Biochrome AG
EDTA	Sigma-Aldrich
Ethanol (79 %, 96 %)	Zentralapotheke des Klinikums
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Formafix 4 %	Zentralapotheke des Klinikums
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA
Glycerin	Sigma-Aldrich
Iodoacetamid	Sigma-Aldrich
Isopropanol	J.T.Baker
Isotonische Kochsalzlösung 0,9 %	Braun
Mayer's Hämalun	Merck
MEM Non-essential Amino Acid (100x)	Gibco
Methanol	J.T.Baker
Methylcellulose	Sigma-Aldrich
Mutaflor® Suspension	Ardeypharm
Natrium Dodecylsulfate (SDS)	Roth
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer	Invitrogen
Orange G	Sigma-Aldrich

Paraformaldehyd	Roth
Pertex Eindeckmedium	Leica Biosystems
Phenol	Sigma-Aldrich
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich
Phosphate Buffered Saline (PBS) 10x	Gibco
Polyvinylalkohol	Sigma-Aldrich
RPMI 1640 Medium	Biochrome AG
Schwefelsäure	Zentralapotheke des Klinikums
TaqMan Master Mix	Applied Biosystems, Bioline
TEMED	Sigma-Aldrich
Tissue Tek	Sakura
TNBS	Fluka
Tris	Roth
Triton X-100	Roth
TRIzol® Reagent	Invitrogen
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Trypsin EDTA (5 %)	Gibco
Tween 20	Roth
UltraPure™ TBE-Puffer 10x	Invitrogen
Wasserstoffperoxid 35 %	Merck
WST-Reagent	Roche
Ziegenserum	Vector Laboratories
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

3.1.4 verwendete Kits

Name	Firma
ABC Staining System	Vector Laboratories

Cell Proliferation ELISA BrdU (colorimetric)	Roche
Human IL-8 ELISA Kit	Invitrogen
Substrate Kit für Peroxidase	Vector Laboratories

3.1.5 verwendete Antikörper für die Immunhistochemie

Spezifität	Spezies	Klon	Isotyp	Verdünnung	Hersteller
CD4	mouse	OX-38	IgG2a	1:100	BD Pharmingen
CD8	mouse	OX-8	IgG1	1:100	BD Pharmingen
CD68	mouse	ED1	IgG1	1:500	AbD serotec
TCR α/β	mouse	R73	IgG1	1:100	BD Pharmingen
TCR δ/γ	mouse	V65	IgG1	1:100	AbD serotec
biotinylated anti mouse	goat		IgG	1:2000	Vector Laboratories

3.1.6 Stimulanzien

Name	Firma
Lipopolysaccharides from E.coli 055:B5	Sigma-Aldrich
Lipopolysaccharides from S.enterica R595	Sigma-Aldrich
Lipid A monophosphoryl from S.enterica R595	Sigma-Aldrich
Lipid A diphosphoryl from S.enterica R595	Sigma-Aldrich
Recombinant Human Interleukin 6 (IL-6)	ImmunoTools
Recombinant Human Interferon Gamma (IFN γ)	ImmunoTools
Recombinant Human Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α)	ImmunoTools
Recombinant Human Interleukin 1 beta (IL-1 β)	ImmunoTools

3.1.7 Enzyme

Alle Enzyme wurden entsprechend den Herstellerangaben und in den mitgelieferten Puffern angesetzt. Für die quantitative PCR der Ratten cDNA wurde der TaqMan Universal PCR Master Mix mit der darin enthaltenen AmpliTaq Gold® DNA Polymerase verwendet. Die

Name	Firma
SuperScript II reverse Transcriptase	Invitrogen
Taq DNA Polymerase	Quiagen
Alkaline Phosphatase calf intestinal	Biolabs
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems
SensiFast™ Probe	Bioline

PBS 1x

(1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 80 mM Na₂HPO₄, 20 mM KH₂PO₄)

TRIS/HCl 10 mM

Mit 100 ml Aqua dest.mischen und den pH-Wert auf 8 einstellen mit HCl.

(0,9 M TRIS, 0,9 M Borsäure, 0,02 M EDTA)

3.1.9 Lösungen und Puffer für EMSA

MgCl ₂ (15 mM)	152 mg auf 50 ml Aqua dest.
---------------------------	-----------------------------

EDTA (100 mM)	3,72 mg in 100 ml Aqua dest. (pH 8)
Leupeptin	1 mg in 1 ml Aqua dest.
Proteasecocktail Complete™	1 Tablette in 2,4 ml Aqua dest.
Vanadat (100 mM)	183,9 mg in 10 ml Aqua dest.

Shiftstammlösung 10x

TRIS (100 mM)	0,121 g
NaCl (500 mM)	0,292 g
EDTA (1 mM), pH 8	100 µl
Ad 10 ml Aqua dest.	

TE-Puffer

EDTA (1 mM), pH 8	1 ml
Ad 100 ml TRIS-HCl 10 mM	

Puffer A

HEPES (10 mM)	5 ml
KCl	2,5 ml
MgCl ₂ (1,5 mM)	2,5 ml
DTT (0,5 mM)	125 µl
Leupeptin	18 µl
Proteasecocktail	1 ml
Vanadat (1 mM)	250 µl
Ad 25 ml Aqua dest.	

Puffer B

HEPES (20 mM)	4 ml
MgCl ₂ (1,5 mM)	1 ml
DTT (0,5 mM)	50 µl
Glycerol (25 %)	2,5 ml
NaCl (420 mM)	246 mg

EDTA (0,2 mM)	20 µl
Leupeptin	7 µl
Proteasecocktail	400 µl
Vanadat (1 mM)	100 µl
Ad 10 ml Aqua dest.	

Shift-Puffer

Shiftstammlösung 1x	25 µl
Glycerin (5 %)	12,5 µl
NP40 (0,1 %)	2,5 µl
DTT (0,1 M)	2,5 ml
Pefablock (100 mg/ml)	2,5 µl
Ad 250 µl Aqua dest.	

3.1.10 Lösungen für RNA-Elektrophorese**TAE-Puffer 50x**

TRIS	242 g
EDTA	18,61 g
Essigsäure	57 ml
Ad 1000 ml Aqua dest.	

Probenpuffer

Glycerine	12,5 ml
EDTA (0,5 M)	6 ml
TRIS (1 M)	0,25 ml
Orange G	eine Spatelspitze
Ad. 25 ml Aqua dest.	

3.2 Tiermodell

Die Etablierung des Kurzzeitschädigungsmodells erfolgte an männlichen Lewis-Ratten mit einem Körpergewicht von 170-200 g, welche von Charles River (Wiga, Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden. Die Tiere wurden artgerecht in einem klimatisierten Raum der Zentralen Versuchstierhaltung des Instituts für Experimentelle Chirurgie bei zwölfstündigem Tag-/Nachtzyklus unter Bereitstellung von Futter und Wasser ad libitum gehalten. Die Genehmigung für die Tierversuche erteilte das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (7221.3,1.2,041/11 (1.1-065/08)). Die männlichen Lewis-Ratten wurden 15 Stunden vor Beginn des Versuches nüchtern gesetzt. Der Eingriff erfolgte an spontan atmenden Ratten unter Pentobarbital-Anästhesie (50 mg/kg KG, i.p.) Die Narkose wurde durch repetitive Injektionen von Pentobarbital (20 mg/kg KG, i.p.) aufrechterhalten. Während des gesamten Versuches lagerten die Tiere auf einer elektronisch gesteuerten Heizplatte, welche durch eine rektal platzierte Sonde konstant bei 37°C gehalten wurde. Nach erfolgreicher Anästhesie wurden die Tiere am Bauch rasiert, die Bauchdecke mit Ethanol (70 %) sterilisiert und die Bauchhöhle anschließend laparotomiert. Zur Ein- und Ausleitung der benötigten Katheter wurden jeweils drei Perforationen durch Muskel- und Hautschicht der Bauchdecke mittels stumpfer Dissektion durchgenommen. Das zu perfundierende Teilstück des Jejunums mit intaktem vaskulärem Gefäßsystem wurde vorsichtig mit einer anatomischen Pinzette ausgelagert. Während der nachfolgenden Prozedur erfolgte immer wieder eine Anfeuchtung des Gewebes mit körperwarmer Kochsalzlösung. Eine kleine Inzision proximal und distal des Segmentes ermöglichte die Einführung der Katheter für die Perfusion, welche mit chirurgischen Fäden (Prolene 6-0) fixiert wurden. Ein dritter Katheter proximal zum perfundierten Segment erleichterte den Abfluss von eventuell noch vorhandener Restflüssigkeit aus dem oberen Dünndarm. Um ein Auskühlen und Austrocknen des Gewebes zu vermeiden, wurde das Jejunum-Segment vorsichtig in das Peritoneum zurückverlagert. Die Bauchdecke wurde in zwei Schichten mit chirurgischem Nahtmaterial geschlossen. Anschließend erfolgte die Perfusion des Jejunum-Segments durch eine an den proximalen Katheter angeschlossene Pumpe mit einem Durchflussvolumen von 0,2 ml/min. Alle zu perfundierenden Flüssigkeiten wurden mittels einer Heizplatte auf 37°C erwärmt. Zu Beginn wurde das Segment für einige Minuten mit Kochsalzlösung perfundiert, anschließend erfolgte die Induktion der Entzündung. Die abschließende Euthanasie der Tiere erfolgt in tiefer Narkose durch Herzpunktion. Der gesamte Aufbau des Versuches ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

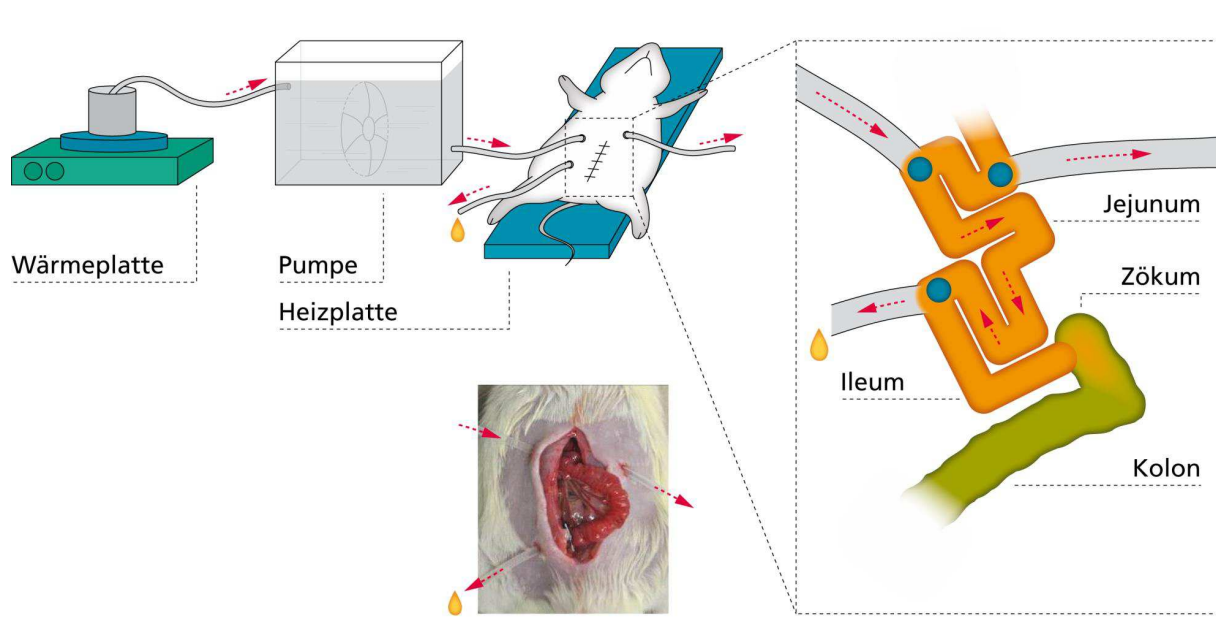


Abb. 3 Schematische Darstellung vom Versuchsaufbau.

3.2.1 Tiergruppen

Um eine Entzündung im Jejunum-Segment innerhalb kürzester Zeit zu induzieren, kamen zu Beginn verschiedene Chemikalien zum Einsatz. Es handelte sich dabei um die toxischen Noxen Natriumdextransulfat (DSS, 1 %) und Trinitrobenzen-Sulfonsäure (TNBS, 0,1 M), welche auch in Langzeit-Kolitis-Tiermodellen eingesetzt werden. Da beide Noxen für das Kurzzeitschädigungsmodell nicht geeignet waren, wurde die intestinale Entzündung mit der Chemikalie Iodoacetamid (IA, 1 %) induziert.

Der Perfusions-Zeitplan sah dabei wie folgt aus: Zu Beginn wurde die chemische Noxe für 15 Minuten durch das Darmsegment perfundiert, gefolgt von einer zweistündigen Perfusion mit dem Kontrollmedium Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM).

Um den Einfluss von Therapeutika auf die induzierte Entzündung zu analysieren, wurde bei einigen Tieren das Kontrollmedium durch ein Therapeutikum ersetzt. Dabei handelte es sich um das Glukokortikoid Dexamethason (1 mg/kg KG) und das Probiotikum Mutaflor® (3x10E8 CFU). Vom Kooperationspartner FIM Biotech wurde die Tonsuspension Resormin zur Verfügung gestellt, welche ebenfalls als mögliche Therapieoption im Kurzzeitschädigungsmodell eingesetzt wurde. Alle Tiergruppen sind im Folgenden aufgeführt:

- IA+Kontrollmedium
- IA+Mutaflor®
- IA+Dexamethason
- IA+Resormin

3.2.2 Organentnahme und Gewebeasservierung

Nach erfolgreicher Herzpunktion erfolgte die Eröffnung des Peritoneums mit einem medianen Longitudinaschnitts. Im Anschluss daran wurden das perfundierte Jejunum-Segment sowie unbehandelte Dünndarmabschnitte proximal und distal reseziert. Ein Teil des Gewebes wurde sofort in Kryoröhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff für die nachfolgende RNA-Isolation schockgefroren. Der Rest des Segmentes wurde von distal nach proximal aufgerollt und mittig geteilt. Eine Hälfte wurde für histologische Begutachtungen in 4 % Formalin fixiert. Die andere Hälfte wurde für immunhistochemische Färbungen in TissueTek eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Immunhistologische Färbungen

Die Immunhistologischen Untersuchungen erfolgten an 6 µm dicken Gefrierschnitten des perfundierten Darmsegmentes. Hierbei kam die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex) zum Einsatz. Dabei bindet ein unkonjugierter Primärantikörper an sein Antigen-Epitop. Dieser Antikörper wird von einem biotinylierten Sekundärantikörper erkannt. Eine Avidin-markierte Peroxidase bindet anschließend an den biotinylierten Sekundärantikörper. Die Visualisierung erfolgte durch Zugabe eines Chromogens, welches durch das Enzym in einen Farbkomplex umgewandelt wird. Bei der Entwicklungsreaktion dient die Peroxidase als Substrat und das 3,3 Diaminobenzidin (DAB) als Chromogen. Das entstehende braungefärbte Endprodukt markiert die positiven Zellen.

Alle Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt. Der primäre und sekundäre Antikörper wurde mit Blocking-Serum verdünnt. Vor Beginn der immunhistochemischen Arbeiten wurden die Kryoschnitte für drei Minuten in eiskaltem Methanol fixiert und mit PBS gespült. Zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität im Gewebe wurden die Schnitte anschließend für fünf Minuten in 3 % H₂O₂ geblockt und dreimal mit PBS gewaschen. Da im Darmgewebe viel endogenes Biotin vorkommt, kann sich dieses auch an Avidin binden und einen Avidin-Biotin-Enzymkomplex bilden, was zu falsch positiven Resultaten bei der ABC-Methode führt (siehe oben). Das endogene Biotin wird durch eine 15-minütige Inkubation mit Avidinlösung, gefolgt von 15 Minuten Inkubation mit Biotinlösung geblockt und steht als Bindungspartner dann nicht mehr zur Verfügung. Die Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen erfolgte für eine Stunde mit 2 % Blocking-Serum (Ziegenserum in PBS). Dann wurden die Gewebeschnitte für 90 Minuten mit dem primären Antikörper inkubiert und es entstand ein Antigen-Antikörper-Komplex. Nachdem die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen wurden, erfolgte die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper Ziege-anti-rabbit (1:2000) für 30 Minuten. Die Präparate wurden wieder dreimal mit PBS gewaschen, 30 Minuten mit dem Avidin-Peroxidase-Reagenz inkubiert und anschließend mit dem Chromogen versetzt. Im Anschluss erfolgte noch eine Kernfärbung mit Hämalaun für fünf Minuten und Bläuen der Schnitte mit lauwarmem Leitungswasser.

Abschließend wurden die Präparate in Pertex eingebettet und am Lichtmikroskop ausgewertet.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Isolierung der RNA

Die Isolierung der RNA erfolgte aus Zellen bzw. Rattendarmfragmenten. Die Zellen wurden, nach zweimaligem Waschen mit PBS mit dem TRIzol Reagent versetzt (pro 12 well 1 ml Trizol) und in ein Eppendorftube überführt. Die Gewebefragmente wurden zunächst mithilfe des TissueRuptor in 1 ml TRIzol Reagent homogenisiert. Danach wurde 0,2 ml Chloroform je 1 ml Trizol zugefügt, vorsichtig vermischt und für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 12.000 g und 4°C. Die RNA-haltige wässrige Phase wurde abgenommen, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und zur RNA-Präzipitation mit demselben Volumen Isopropanol versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation bei 12.000 g für 20 Minuten bei 4°C wurde der Überstand verworfen und das entstandene RNA-Pellet gewaschen. Dazu wurde das Pellet in 1 ml 75%igen Ethanol resuspendiert, bei 7.500 g und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde zweimal durchgeführt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das RNA-Pellet für fünf Minuten luftgetrocknet und in RNase und DNase freiem Wasser gelöst (Zellen: 30 µl, Gewebe: 40 µl). Zur besseren Elution der RNA-Proben erfolgte eine 5-minütige Inkubation im Heizblock bei 50°C. Die RNA-Proben wurden sofort auf Eis oder bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.4.2 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration wurde am NanoDrop bei einer OD von 260 nm photometrisch bestimmt. Die Konzentration der RNA berechnet sich aus $OD_{260} \times 40 \mu\text{g/ml}$. Zur Analyse der Reinheit der dargestellten RNA wurde zusätzlich die $OD_{280\text{nm}}$ bestimmt. Falls der Quotient aus OD_{260} und OD_{280} zwischen 1,8 und 2 lag, wurde die RNA weiter verändert und andernfalls verworfen.

3.4.3 Kontrolle der RNA in Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Reinheit und Unversehrtheit wurden die RNA mittels Agaroseelektrophorese analysiert. Es wurde ein 1,2%iges Agarosegel hergestellt, das zusätzlich 0,1 µg/ml Ethidiumbromid enthielt. Als Laufpuffer wurde 0,5x TAE-Puffer verwendet. 1 µg RNA wurde mit 2 µl Probenpuffer versetzt und gegebenenfalls auf 8 µl mit RNase und DNase freiem Wasser aufgefüllt. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einer Elektrophorese-Apparatur für 30 Minuten bei 90 V. Die Proben wurden unter UV-Licht fotografiert und dokumentiert. Bei intakter RNA sind zwei deutlich getrennte Banden, die 28S- und 18S-Bande der ribosomalen RNA, zu erkennen.

3.4.4 Reverse Transkription

Die dargestellte mRNA wurde mittels Reverse-Transkriptase–Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) in die stabilere cDNA transkribiert. Dazu wurde die RNA zunächst auf eine Konzentration von 1 µg Zell-RNA oder 3 µg Gewebe-RNA in 22 µl H₂O eingestellt und mit Oligo-(dt₁₂₋₁₈)-Primer versetzt. Die Proben wurden dann in einem Heizblock bei 70°C für zehn Minuten inkubiert und im Anschluss 17,5 µl Mastermix zugegeben, um ein Gesamtvolumen von 40 µl zu erhalten. Pro Ansatz wurde folgender Mastermix verwendet:

- | | |
|---------------------------------|--------|
| • 5x Reaktionspuffer | 8 µl |
| • DTT (0,1 M) | 4 µl |
| • dNTP Mix 2,5 mM | 4 µl |
| • RNasin (20 units) | 0,5 µl |
| • Superscript RT II (200 units) | 1 µl |

Nach Zentrifugation wurden die Proben in einen Thermocycler überführt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Der Reaktionsstopp erfolgte durch das Erhitzen der Proben auf 95°C für fünf Minuten. Die resultierende cDNA wurde anschließend auf Eis gelagert oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C.

3.4.5 Quantitative Real-time-Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction, PCR) dient der selektiven Amplifizierung eines ausgewählten Abschnitts in einem DNA-Molekül. Man benötigt für die PCR zwei synthetische Oligonukleotide, deren Sequenz jeweils zu einem der beiden DNA-Stränge komplementär ist. Der von diesen beiden Primern flankierte DNA-Bereich wird in der PCR mithilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase I aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) amplifiziert. Diese besitzt die Eigenschaft, einen Einzelstrang zum Doppelstrang aufzupolymerisieren, wenn ihr ein kurzer doppelsträngiger Bereich als Primer zur Verfügung steht. Die Thermostabilität der Polymerase ist notwendig, da der Reaktionsansatz während der PCR zur Trennung der komplementären DNA-Stränge auf 95°C erhitzt wird, wobei das Enzym aktiv bleiben muss und daher nicht denaturiert werden darf.

Bei der quantitativen Real-time-PCR handelt es sich um eine Methode der vergleichenden PCR-Analyse, welche die Analyse der Expressionsstärke spezifischer mRNAs in Proben erlaubt. Das Prinzip der TaqMan-PCR beruht auf dem Einsatz einer Sonde mit einer spezifischen Sequenz, welche in dem von den verwendeten Primern begrenzten DNA-Abschnitt bindet. An der Sonde befindet sich an ihrem 5'-Ende ein Reporter und an ihrem 3'-Ende ein Quencher. Das fluoreszierende Signal entsteht erst, wenn bei der Amplifikation durch die Taq-DNA-Polymerase der Reporter der gebundenen Sonde vom Quencher abgespalten wird und somit die Fluoreszenz des Reporters durch räumliche Entfernung vom Quencher nicht mehr unterdrückt werden kann. Software-gestützt wird die Intensität des

fluoreszierenden Signals in jedem Elongationsschritt der PCR aufgezeichnet. Ist die zu detektierende DNA nicht vorhanden, kommt es im Idealfall zu keinem Signal. Es könnte aber auch ein sehr spätes Signal gemessen werden, das auf der Amplifikation unspezifischer Fragmente beruht. Um den Zyklus zu bestimmen, ab dem eine logarithmische Fluoreszenzzunahme zu messen ist, wird Software-gesteuert in jeder Real-time PCR der Threshold-Cycle (Schwellenwert-Zyklus) festgelegt. Eine Probe gilt ab dem Zyklus als positiv, in welchem ihre Amplifikationskurve die Threshold-Gerade schneidet (CT-Wert der Probe). In dieser Arbeit wurden „TaqMan® Gene Expression Assays“ der Firma Life Technologies verwendet (Tab. 1). Jedes Assay ist spezifisch für ein Targetgen und enthält Primer und eine Hybridisierungssonde mit komplementärer Sequenz zum ausgewählten Gen-Abschnitt.

Tab. 1 Die zur mRNA-Quantifizierung am ABI Prism verwendeten Hybridisierungssonden.

Gen	TaqMan® Assay	Spezies
HPRT	Rn01527840_m1	Ratte
IL-1 β	Rn00580432_m1	
IL-6	Rn00561420_m1	
IL-10	Rn00563409_m1	
MCP-1	Rn00580555_m1	
GAPDH	Hs99999905_m1	Human
IL-8	Hs00174103_m1	
MCP-1	Hs00234140_m1	

Für jede Probe wurde ein Mastermix mit den jeweiligen Assay on demand angesetzt in 10 μ l Gesamtvolumen.

- TaqMan-UniversalPCR Master Mix 6,25 μ l
- TaqMan Gene-Expression Assay 0,625 μ l
- H₂O 3,125 μ l

Zu jedem Ansatz wurden 2,5 μ l cDNA zugefügt und auf eine 96well PCR Platte pipettiert. Die Platte wurde mit einer optisch durchlässigen Folie geschlossen und kurz zentrifugiert.

Die Durchführung der Real Time PCR erfolgte im ABI Prism 7000 (Applied Biosystems) unter in Tabelle 2 aufgelisteten Bedingungen. Jedes Gen wurde in einer Dreifachbestimmung untersucht.

Tab. 2 Standard-Programm zur Amplifizierung von cDNA mittels PCR.

Vorgang	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	1 s	30
Annealing	60°C	1 min	

3.4.6 Auswertung der quantitativen Real-Time-PCR

Der Quantifizierung einer PCR-Reaktion wird der sogenannte „Cycle-threshold“ (C_T)-Wert zugrunde gelegt. Dieser gibt die Zyklenzahl an, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Ist die eingesetzte cDNA-Menge gering, ist der C_T -Wert hoch und umgekehrt. Somit steht die eingesetzte cDNA-Menge in direkter Beziehung zum C_T -Wert. Um die Expression der zu untersuchenden Gene zu quantifizieren, werden sie auf einen Mittelwert eines homogen exprimierten und ubiquitären Gens bezogen. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Referenzgenen handelte es sich um Hypoxanthine-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) für die Ratte und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) für die humanen Zellen. Zur Berechnung der Expressionsunterschiede wurde die $\Delta\Delta C_T$ -Methode verwendet. Zunächst wurde der ΔC_T -Wert jeder Probe berechnet. Dafür wurde der C_T -Wert des Referenzgens (HPRT oder GAPDH) vom C_T -Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert ($\Delta C_T = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Referenzgen}$). Zur Berechnung des $\Delta\Delta C_T$ -Wertes wurde der ΔC_T -Wert der stimulierten Kontrolle vom ΔC_T -Wert der nicht-stimulierten Kontrolle abgezogen ($\Delta\Delta C_T = (\Delta C_T \text{ nicht-stimulierte} - \Delta C_T \text{ stimulierte})$). Aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$ konnten relative Expressionsunterschiede einer stimulierten Probe zur unbehandelten Kontrolle dargestellt werden.

3.4.7 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Der Nachweis von aktiviertem NF- κ B im Zellkern kann durch den „Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) erfolgen. Dieser beruht auf dem Prinzip, dass DNA-Protein-Komplexe langsamer in einem Polyacrylamid-Gel migrieren, als freie DNA Fragmente. Dazu werden radioaktiv markierte Oligonukleotide, die eine spezifische NF- κ B-Konsensussequenz enthalten, mit einem Zellkernextrakt inkubiert, anschließend in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch analysiert und das Gel abschließend autoradiographisch exponiert.

Durch Zugabe spezifischer Antikörper in den Inkubationsansatz kann die Identität der Untereinheiten des NF- κ B analysiert werden. Die spezifischen Antikörper binden an den Komplex aus markierter DNA und Transkriptionsfaktor und führen zu einer weiteren Retardierung des Komplexes im Gel. Man erkennt dann einen sogenannten „Supershift“.

Zur Durchführung eines Gelshiftexperimentes wurde die folgende NF- κ B-Oligonukleotid verwendet: 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'. Das Oligonukleotid wurde mittels

T4-Polynukleotidkinase endmarkiert. Dazu wurden zwei einzelsträngige, zueinander komplementäre Oligonukleotide (sense und antisense, je 50 μ M, Biotez) äquimolar gemischt, für zehn Minuten bei 80°C erhitzt und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Die nun doppelsträngige DNA (dsDNA) wurde mit H₂O auf eine Endkonzentration von 1,25 pmol/ μ l eingestellt. Diese Stammlösung wurde bei -20°C gelagert.

Zur Endmarkierung der dsDNA wurde der folgende Ansatz vorbereitet:

- dsDNA 1 μ l
- Kinasepuffer (10x) 2 μ l
- T4-Polynukleotidkinase 1 μ l
- γ -³² ATP 2,5 μ l
- H₂O 13,5 μ l

Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und nicht-eingebautes ³²P- γ -ATP mittels Sephadex G50-Säulenreinigung nach Herstellerangaben entfernt. Das Elutionsvolumen betrug 400 μ l und die Sonde wurde bei -20°C aufbewahrt.

Zur Untersuchung der NF- κ B Aktivierung wurden die IEC-6 Zellen einen Tag vor der Stimulation auf 6-well Zellkulturplatten in einer solchen Dichte ausgesät, dass am darauffolgenden Tag eine etwa 90%ige Konfluenz erreicht wurde.

Eine Stunde vor Stimulation wurden die Zellen mit Serum-reduziertem Medium (0,5 % FKS) inkubiert. Als Stimulantien wurden LPS (1 μ g/ml), Lipid A diphosphoryliert/monophosphoryliert (1 μ g/ml), TNF α (10 ng/ml) und cIAP (1 U) untersucht. Die Stimulationsdauer betrug 5; 20 oder 60 Minuten.

Nach der Stimulation wurden die Zellen auf Eis gestellt, das Medium abgenommen und die Zellen 1x mit PBS (pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Puffer A bei 4°C für zehn Minuten lysiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Zellkulturplatte gelöst, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Die lysierten Zellmembranen wurden anschließend mittels Zentrifugation (U_{max} , 1 min, 4°C) abgetrennt. Das Zellkern-Pellet wurde in 30 μ l Puffer B resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (U_{max} , 2 min, 4°C) wurde der Überstand (Kernproteine) abgenommen und bei -80°C gelagert.

Für die Bindungsreaktion des Transkriptionsfaktors an die radioaktiv markierte dsDNA wurde der folgende Ansatz vorbereitet:

- Shift-Puffer 4 μ l
- BSA (10 mg/ml) 2 μ l
- Poly-dI-dC (1 μ g/ μ l) 1 μ l
- Kernextrakt 4 μ l
- Sonde 2,5 μ l

- Aqua dest. 7,5 µl

Eine 30-minütige Inkubation bei 27°C führte zur Bildung der DNA/Protein-Komplexe.

Zur Charakterisierung der Identität des Transkriptionsfaktors wurde parallel ein Supershift-Experiment durchgeführt. Dazu wurde vor der Zugabe der radioaktiv markierten dsDNA 1 µl p65/ NF-κB-spezifischer Antikörper (Santa Cruz, sc 372x) zum Versuchsansatz gegeben und für 20 Minuten auf Eis inkubiert.

Die EMSA-Analyse wurde in einem nicht-denaturierenden 6%igen Polyacrylamid-Gel (33 ml H₂O, 6 ml Acrylamid/Bis (40 %, 29:1), 1 ml 10 x TBE (Invitrogen), 240 µl 10 % Ammoniumpersulfat, 80 µl TEMED) durchgeführt. Die Elektrophorese-Bedingungen waren 300 V für zwei Stunden und als Laufpuffer wurde 0,25 x TBE-Puffer (pH 8,4) verwendet. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele getrocknet und autoradiographisch am Phosphor Imager Fujifilm BAS-1800 II ausgewertet. Die densitometrische Auswertung der Bandenintensität erfolgte mithilfe des Programms Aida Image Analyzer v. 3.25.

3.5 Methoden der Zellkultur

Alle in der vorliegenden Dissertation verwendeten Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen und sind in der Tabelle 3 aufgelistet.

Tab. 3 Verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Ursprung	Beschreibung
Caco-2	Kolon-Adenokarzinom	Humane Kolonepithelzellen
IEC-6	Dünndarm	Ratten-Epithelzelllinien
SW480	Kolon-Adenokarzinom	Humane Kolonepithelzellen
THP-1	Akute monozytische Leukämie	Humane Monozyten

3.5.1 Auftauen von Zellen

Das Auftauen von kryokonservierten Zellen sollte möglichst schnell erfolgen, um den Kontakt der Zellen mit dem Zellgift Dimethylsulfoxid (DMSO) zu minimieren. Die Kryoröhren wurden aus dem Flüssigstickstofftank entnommen und im Wasserbad bei 37°C angetaut. Anschließend wurde das DMSO-Zellgemisch in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit dem zellspezifischen Medium auf 5 ml aufgefüllt. Nach Zentrifugation (200g, 5 min, 21°C) wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 5 ml Zellmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen eingesät.

3.5.2 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen geerntet, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (siehe oben). Die Zellzahl wurde anschließend bestimmt und jeweils 500.000 Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium, bestehend aus FKS + 15 % DMSO,

aufgenommen. Anschließend wurde die Suspension in 2 ml Kryoröhrchen überführt und für mindestens 24 Stunden bei -80°C gelagert. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -196°C in Flüssigstickstoff.

3.5.3 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde Trypanblau verwendet. Zellen, deren Membran nicht mehr intakt ist, werden blau angefärbt und konnten somit von vitalen Zellen differenziert werden. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde mit PBS und Trypanblau 1:4 verdünnt und 10 µl dieser Verdünnung wurden in eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer überführt. Die Zählfläche der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ist in 4 x 4 Großquadrate mit einer Kantenlänge von jeweils 1 mm aufgeteilt. Die 16 großen Quadrate enthalten jeweils wiederum 16 kleinere Quadrate, so dass insgesamt ein Raster von 256 kleinen Quadraten entsteht. Die Dimensionen der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer betragen für die Gesamtfläche 16 mm², für die Tiefe 0,2 mm und für das Volumen 3,2 µl. Nach der Auszählung erfolgt die Berechnung der Zellzahl pro ml Untersuchungsmaterial nach folgender Formel:

$$Z_U = Z_a / F_a * \text{Kammertiefe [mm]} * V_U$$

mit:

- Z_U = Zellen pro ml Untersuchungsmaterial
- Z_a = ausgezählte Zellen
- F_a = ausgezählte Fläche [mm²]
- V_U = Verdünnung des Untersuchungsmaterials

3.5.4 Kultivierung von Caco-2-Zellen

Caco-2-Zellen wurden in DMEM mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum, Antibiotic-Antimycotic-Mix (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0,25 mg/ml Antimycotic) und 1 % nicht-essentielle Aminosäuren bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Die Caco-2-Zellen stellen den „Goldstandard“ im Bereich der intestinalen Zellbiologie als zelluläres Modell für differenzierte und polarisierte Epithelzellen dar. Sie zeigen die gleichen Charakteristika der Differenzierung, wie normale intestinale Enterozyten [208]. Dazu zählen: polare Differenzierung, apikale und basale Abgrenzung durch die Ausbildung von TJ, Desmosomen und Mikrovillistrukturen [209]. Um eine ausreichende Differenzierung der Zellen zu erreichen, wurden sie für mindestens 21 Tage postkonfluent kultiviert. Mit diesen differenzierten Caco-2-Zellen wurden die nachfolgend beschriebenen Versuche durchgeführt.

3.5.5 Kultivierung von SW480- und THP-1-Zellen

SW480- und THP-1-Zellen wurden in RPMI-1690 mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum und Antibiotic-Antimycotic-Mix (s. o.) bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert.

3.5.6 Kultivierung von IEC-6-Zellen

IEC-6-Zellen wurden in DMEM mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum und Antibiotic-Antimycotic-Mix (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0,25 mg/ml Antimycotic) bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert.

3.5.7 Kultivierung und Passagieren von Zellen

Bei allen Zellkulturen wurde ein Mediumwechsel alle 3-4 Tage durchgeführt. Eine Ausnahme stellten die Caco-2-Zellen dar; hier wurde der Mediumwechsel alle 2 Tage ab Erreichen der Konfluenz durchgeführt. Epithelzellen sind adhärente Zellen und haften auf den Oberflächen der Zellkulturflaschen. Bei Erreichen einer 80%igen Konfluenz wurden die Zellen passagiert, d. h. die adhärennten Zellen wurden mit Trypsin/EDTA behandelt und die abgelösten Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Bei den THP-1 Suspensionszellen entfiel dieser Schritt. Diese wurde zusammen mit dem Medium in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (s. o.) wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und aliquotiert in neue Zellkulturflaschen ausgesät. Die Passage wurde notiert.

3.5.8 Herstellung der Tonsuspensionen

Der Kooperationspartner FIM Biotech stellte für die Untersuchungen drei verschiedene Tonmineralien zur Verfügung. Um die Bindekapazität des Wechsellagerungsminerals zu steigern, wurde das Rohmaterial weiter zerkleinert, was die Anzahl der Bruchkanten erhöht und nicht-quellfähige Bestandteile wie Quarz abreichert. Dabei entstanden neben dem Ausgangsprodukt mit einer Teilchengröße von < 15 µm, weitere Produkte mit einer Teilchengröße von < 5 µm und von < 2 µm. Für die weitere Verwendung wurde von jedem Tonmineral eine 10%ige Tonsuspension hergestellt. Dafür wurden 10 g Ton eingewogen und mit 90 ml sterilem *aqua dest.* aufgefüllt. Nach Quellung über drei Tage wurden die Tonsuspensionen autoklaviert. Diese Vorbereitung ermöglichte ein steriles Arbeiten in den Zellkulturen und gewährleistete die Integrität der Tonmineralien.

3.5.9 Proliferationsassay (BrdU-Test)

Als Proliferationsassay wurde der kolorimetrische 5-Brom-2-desoxyuridin-(BrdU)-Test verwendet. Das Prinzip dieser Methode ist der Einbau des Pyrimidinanalogons 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) anstelle der Base Thymidin in neusynthetisierte DNA von Zellen. Mithilfe eines BrdU-spezifischen Antikörpers und einem finalen Farbumschlag, der kolorimetrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm am ELISA detektiert wurde, konnte die Proliferationsaktivität nachgewiesen werden. Für die Analysen wurde eine definierte Zellzahl von SW480- und Caco-2-Zellen in 96well-Zellkulturplatten eingesät. Die Stimulation der Zellen mit den Tonsuspensionen erfolgte dann in Transwell-Einsätzen über 1 bzw. 2 Tagen. Anschließend wurden die Einsätze mit den Tonsuspensionen entfernt und der Einbau des BrdU-Reagenzes in die DNA der Zellen erfolgte für 24 Stunden. Dazu wurde ein Peroxidase markierter Anti-BrdU-Antikörper hinzugegeben, Die Peroxidase setzt das farblose

Chromogen Tetramethylbenzidine (TMB) zu einem blauen Farbstoff um. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Schwefelsäure (1M) gestoppt und der Farbumschlag mittels eines ELISA-Readers bei 450 nm detektiert. Dabei korrelieren die Farbintensität mit der Anzahl proliferierender Zellen. Die BrdU-Messungen wurden dreimal durchgeführt, wobei jede Probe in einer Dreifachbestimmung untersucht wurde.

3.5.10 Vitalitätsassay (WST-Test)

Zum Nachweis der Vitalität der Zellen wurde der 4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen-disulfonat-(WST-)Test verwendet. Hierbei wird die metabolische Aktivität von lebenden Zellen durch Bestimmung der mitochondrialen Aktivität mithilfe des Tetrazolimsalzes WST-1 nachgewiesen. Die Bestimmung basiert auf der Umsetzung von WST-1 und NAD^+ unter der Katalyse mitochondrialer Dehydrogenasen zum entsprechenden Formazan und NADH H^+ . Das entstandene Formazan ist dunkelrot gefärbt und seine Formation kann am ELISA Reader bei 450 nm gemessen werden. Der Stimulationsansatz wurde analog zum BrdU-Test durchgeführt. Nach Entfernen der Transwell-Einsätze erfolgte eine vierstündige Inkubation mit dem WST-Reagenz. Anschließend wurde die Intensität der enzymatischen Reaktion am ELISA Reader bei 450 nm gemessen.

3.5.11 Stimulation mit Zytokinen

Es ist bekannt, dass die dauerhafte Stimulation des darmassoziierten Immunsystems durch luminale Antigene zu einer erhöhten Freisetzung von Zytokinen von Immun- und Epithelzellen führt [2]. Zur Untersuchung einer putativen immunmodulatorischen Aktivität der Tonmineralien wurden deshalb die humanen Epithelzellen über Nacht mit einem Zytokincocktail (ZC) bestehend aus $\text{IL1}\beta$ (25 ng/ml), $\text{TNF}\alpha$ (50 ng/ml), $\text{IFN}\gamma$ (50 ng/ml) und dem Endotoxin LPS E.coli (10 ng/ml) stimuliert [210]. In einem Parallelansatz erfolgte die Koinkubation mit den Tonsuspensionen. Die SW480-Zellen wurden ein bis drei Tage vor Beginn der Stimulation in 12 well-Platten eingesät. Die Caco-2-Zellen waren > 21 Tage in Kultur. Nach Abschluss der Stimulationsversuche wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und für weitere Proteinbestimmungen bei -20°C aufbewahrt (siehe 3.5.12). Aus den Zellen wurde die RNA isoliert und die mRNA-Expression verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine mittels quantitativer Real Time PCR untersucht (siehe 3.4.5).

3.5.12 Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der „Enzym-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) ist ein Nachweisverfahren für Proteine, wie zum Beispiel Zytokine. Prinzip dieser Methode ist der sogenannte „Sandwich-ELISA“, bei der das zu analysierende Antigen durch einen an der Oberfläche einer Mikrotiterplatte haftenden, antigenspezifischen Antikörper gebunden wird. Ein zweiter antigenspezifischer Primärantikörper bindet an das Antigen und wird von einem biotinylierten sekundären Antikörper erkannt, der als Bindungspartner für die Streptavidin-gekoppelte Meeretich-Peroxidase fungiert. Dieses Enzym setzt im Anschluss das Chromogen

Tetramethylbenzidine (TMB) um, was in einen sichtbaren Farbumschlag resultiert. Die Zugabe von H_2SO_4 stoppt diese enzymatische Reaktion. Die Absorption kann anschließend am ELISA-Reader bei 450 nm gemessen werden.

Zur Quantifizierung der gemessenen Signale wird bei jedem ELISA eine Standardreihe mit bekannter Antigenkonzentration mitgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Zytokin IL-8 in Zellkultur-Überständen von Caco-2 und SW480 mithilfe eines kommerziell erhältlichen ELISA human IL-8-Kits (Invitrogen) nach Hersteller-Protokoll gemessen. Jede Probe wurde dabei im Doppelansatz bestimmt.

3.5.13 Zellkultivierung auf Transwell-Einsätzen

Um eine biologische Barriere ähnlich der Epithelzellbarriere im Gastrointestinaltrakt zu simulieren, wurden Caco-2-Zellen auf künstlichen, semipermeablen Trägermembranen aus Polyethylenterephthalat (PET) ausgesät. Transwell-Einsätze besitzen den Vorteil, dass hier die Zellen sowohl von der apikalen als auch basalen Seite stimuliert werden können. In den Versuchen wurden Transwell-Einsätze (BD Falcon) mit einer Porengröße von $0,4\ \mu\text{m}$ und einer Oberfläche von $0,3$ und $0,9\ \text{cm}^2$ verwendet.

3.5.14 Stimulation der Caco-2-Zellen auf Transwell-Einsätzen mit pro-inflammatorischen Zytokinen

Pro-inflammatorische Zytokine, die von Epithelzellen und Zellen des darmassoziierten Immunsystems als Reaktion auf die verstärkte Ansiedlung von luminalen Antigenen sezerniert werden, tragen wesentlich zur Änderung der TJ-Proteinexpression bei [211]. Diese resultiert in einer erhöhten Permeabilität des Darmepithels bei CU-Patienten und dem weiteren Einstrom von luminalen Antigenen [212, 213]. Durch die Stimulation von Caco-2-Zellen mit dem pro-inflammatorischen Zytokin $\text{TNF}\alpha$ kann die epitheliale Barriere *in vitro* ebenfalls beeinflusst werden [214]. Differenzierte Caco-2-Zellen wurden basal mit $\text{TNF}\alpha$ ($25\ \text{ng/ml}$) für 24 Stunden stimuliert. Um den Einfluss der Tonmineralien auf eine gestörte epitheliale Barriere genauer zu untersuchen, wurden die stimulierten Caco-2 mit den drei Tonsuspensionen kokubiert. Dafür wurde in den Transwell-Einsatz mit den Zellen ein kleines Transwell-Einsatz gehängt und mit der Tonsuspension befüllt (Abb. 4).

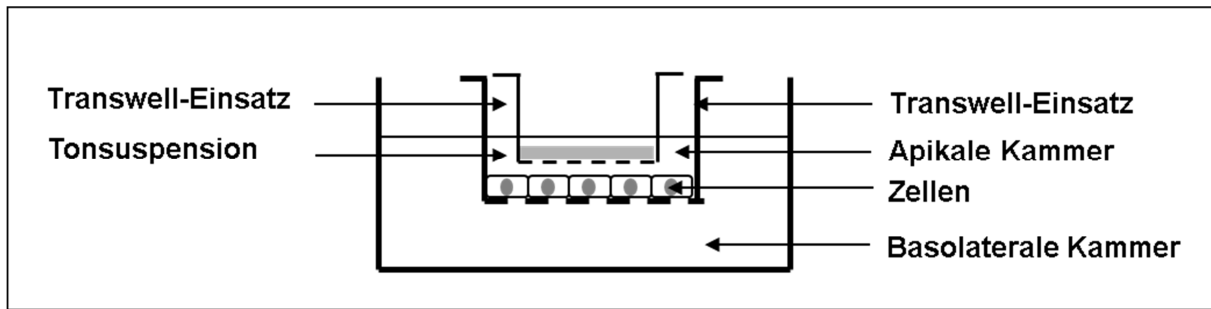


Abb. 4 Schematische Darstellung vom Versuchsaufbau.

3.5.15 Caco-2-Kokultur mit THP-1-Makrophagen

Die Kokultur von Caco-2-Zellen mit zur Makrophagen differenzierten THP-1-Zellen führt ebenfalls zu einer Beeinflussung der epithelialen Barriere [215]. Die Umwandlung der THP-1-Monozyten zur Makrophagen erfolgte mittels Phorbol 12-myristate 13-acetat (PMA), (200 ng/ml) für 48 Stunden [216]. Die differenzierten Makrophagen adhäreren an die Plastikoberfläche der Kulturschalen und konnten durch Mediumwechsel von nicht-adhärerten Zellen depletiert werden. Im Anschluss erfolgte eine weitere 24-stündige Inkubation in RPMI-Vollmedium. Dann wurden Transwelleinsätze mit differenzierten Caco-2-Zellen zu den differenzierten THP-1-Makrophagen gegeben und für 24 Stunden inkubiert.

3.5.16 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER)

Anhand der transepithelialen Widerstandsmessung kann auf die Konfluenz des epithelialen Monolayers und dessen Barriereeigenschaft geschlossen werden. Der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) wurde anhand des passiven Ionenflusses über das Epithel mit einem Epithelgewebe Voltometer (Millipore, Deutschland) und einer STX-2-Elektrode gemessen. Die Elektrode hatte ein Chopstick-Design, wobei die eine Elektrode 2,5 mm länger als die andere war. Somit konnte das längere Ende im Well platziert werden und das kürzere im Transwell, ohne den epithelialen Monolayer zu verletzen (Abb. 5). Die Elektroden wurden somit durch die Filtermembran und den epithelialen Monolayer voneinander getrennt. Vor Messbeginn musste die Chopstick-Elektrode gründlich mit 70 % Ethanol desinfiziert werden. Direkt vor der Messung wurde die Elektrode mit Medium abgespült. Damit die Filter für den Versuch verwendet werden konnten, mussten sie einen Nettowiderstand von mindestens 300 Ohm x cm² haben. [Nettowiderstand = (gemessener Widerstand-150) x 0,33]. Erst dann erfolgte die Stimulation der Zellen mit TNF α oder differenzierten Makrophagen. Nach 24 Stunden wurde erneut der Widerstand gemessen. Der Hintergrundwiderstand wurde bei jeder Messung durch Transwell-Einsätze ohne Zellen ermittelt. Die gemessenen Werte wurden durch die Subtraktion des Hintergrundwiderstandes normalisiert und in Ω/cm^2 angegeben.

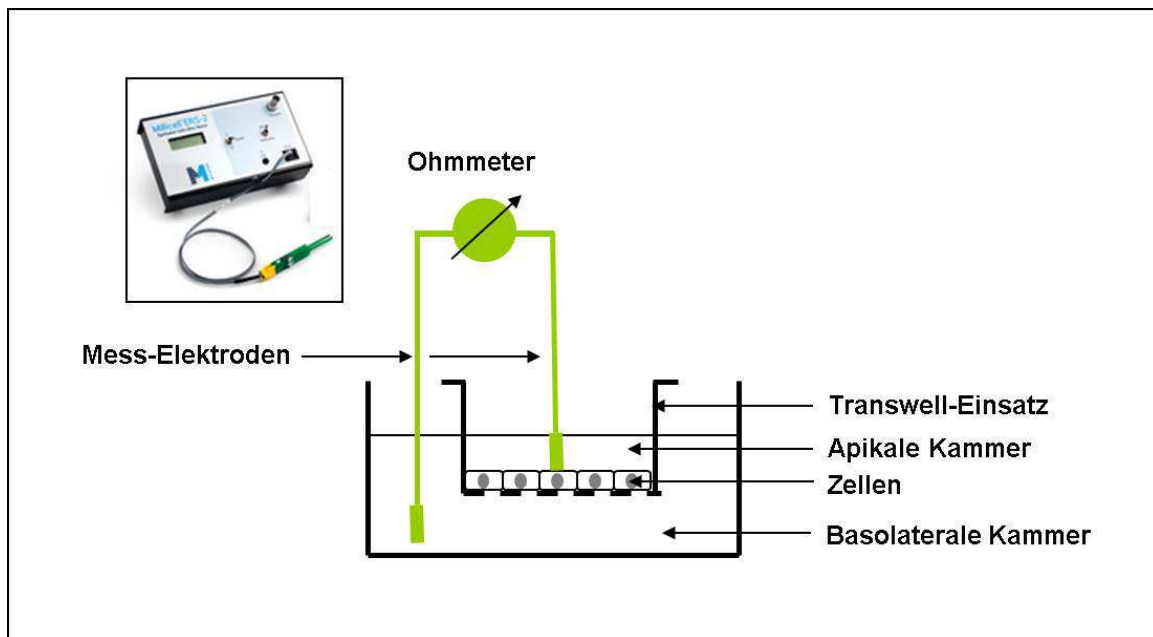


Abb. 5 Messaufbau für TEER-Messung.

3.6 Statistische Methoden

Alle Werte sind als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes angegeben ($MW \pm SEM$). Die Mittelwerte der einzelnen Parameter ergeben sich aus der Anzahl der Versuchstiere bzw. der technischen Replikate in den Zellkulturversuchen.

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung des Softwarepaketes GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Für die *in vivo*- und *in vitro*-Versuche erfolgte der Vergleich unter den Gruppen mithilfe des Mann-Whitney U-Tests. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung des Kurzzeitschädigungsmodells

4.1.1 Perfusion eines Darmsegments mit Kontrollmedium

Zuerst erfolgte die alleinige Perfusion mit dem Kontrollmedium, um auszuschließen, dass der mechanische Vorgang sowie das Kontrollmedium selbst Schäden oder eine Entzündung am Segment induzieren. In Abbildung 6 ist exemplarisch ein H&E-gefärbter Gewebeschnitt nach Perfusion mit Kontrollmedium dargestellt. Zu erkennen ist eine regelmäßige Krypten- und Zottenarchitektur mit einer intakten Zotten-umlaufenden Epithelzellschicht, in der eine Vielzahl von Becherzellen vorkommen. In der darunterliegenden Mukosa und Submukosa konnten keine entzündlichen Zellinfiltrate nachgewiesen werden. Des Weiteren waren die Submukosa und die basal abschließende Muskularis nicht verdickt. Zusammenfassend zeigte die histologische Begutachtung eine normale Darmstruktur von apikal nach basal. Somit konnte durch die alleinige Perfusion mit dem Kontrollmedium keine histologischen Veränderungen im Darmsegment festgestellt werden. Ebenfalls konnten Schäden durch den Perfusionsvorgang an sich ausgeschlossen werden.

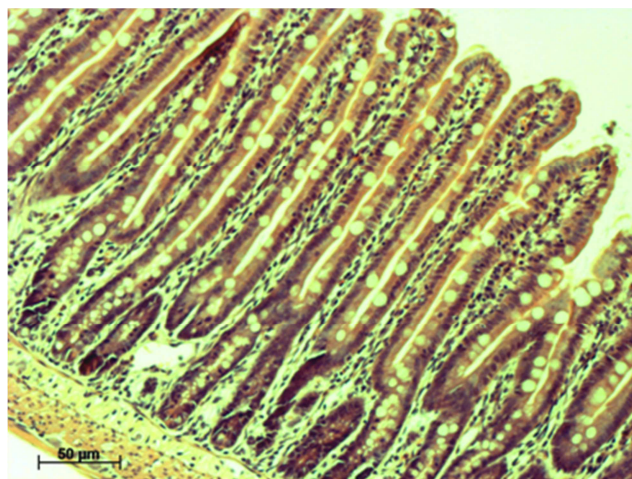


Abb. 6 Histologischer Schnitt eines Dünndarmsegmentes nach *in situ*-Perfusion des Kontrollmediums.

4.1.2 Induktion einer mukosalen Entzündung mittels DSS- und TNBS-Perfusion

Zur schnellen Induktion einer Entzündung im Jejunum-Segment wurden zunächst DSS und TNBS verwendet. Beide Substanzen werden in verschiedenen Tiermodellen verwendet und führen zu einer lokalen Schädigung des Darmepithels, die sich durch einen mukosalen Barriereverlust und eine gesteigerte Permeabilität auszeichnet[163, 170]. In der Folge kommt es zu einer massiven Infiltration von luminalen Antigenen und Mikroorganismen in die Mukosa, die letztendlich in eine erhöhte Stimulation des gastrointestinalen Immunsystems resultiert.

In diesen Voruntersuchungen führte die Perfusion des Darmsegmentes mit 1 % DSS, gefolgt von zwei Stunden Perfusion mit Kontrollmedium, zu einer histologisch erkennbaren Entzündung. Es konnten anschließend keine molekularbiologischen Analysen an den Gewebeproben durchgeführt werden, da DSS ein potenter Inhibitor der quantitativen RT-PCR ist und demzufolge mit einer mRNA-Expressions-Analyse im Gewebe interferierte [217].

Nach einer Perfusion mit 0,1 M TNBS, ebenfalls gefolgt von zwei Stunden Perfusion mit Kontrollmedium, konnte einerseits eine erhöhte Expression pro-inflammatorischer Zytokine nachgewiesen werden, andererseits zeigten sich nur wenige histologische Veränderungen im Darmsegment. Des Weiteren führte die TNBS-Perfusion zu einer Manipulation der Darmzotten, welche eine Anfärbung mit Hämalaun und Eosin verhinderte und somit nachfolgende histologische Untersuchungen unmöglich machte. Derartige TNBS-Effekte sind in der Literatur für TNBS-Langzeit-Kolitis-Modelle nicht beschrieben.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine weitere chemische Noxe, das Iodoacetamid (IA) untersucht.

4.1.3 Induktion einer mukosalen Entzündung mittels IA

Der Sulfhydryl-Blocker IA und seine Anwendung im Tiermodell zur Induktion einer Kolitis wurde erstmalig 1997 von Satoh et al. beschrieben [173]. Dabei ist die Applikation von IA gekennzeichnet durch eine rasche Entwicklung von Erosionen, Ulzerationen sowie vaskulärer Permeabilität im betroffenen Darm [218, 219].

Im Kurzzeitschädigungsmodell wurde das Darmsegment für 15 Minuten mit 1 % IA, gefolgt von zwei Stunden Kontrollmedium, perfundiert. Anschließend wurden die histologischen Veränderungen im Darm, die Migration von Immunzellen und die Expression von Entzündungsmarkern analysiert.

4.1.3.1 Effekte von IA auf die Histologie

Zur genauen Beurteilung des Schweregrades der IA-induzierten Entzündung im perfundierten Darmsegment wurden histologische Präparate des Darms angefertigt. Die Abbildung 8 zeigt charakteristische histologische Entzündungs-Parameter an exemplarischen H&E-Schnitten von perfundierten Darmsegmenten nach IA-Schädigung. Die regelmäßige Krypten- und Zottenarchitektur war teilweise komplett aufgelöst und auf der apikalen Seite lagen vermehrt nekrotische Zellen auf. In der Mukosa wurden massive Einblutungen (A und B) sowie die Infiltration von Neutrophilen beobachtet (C).

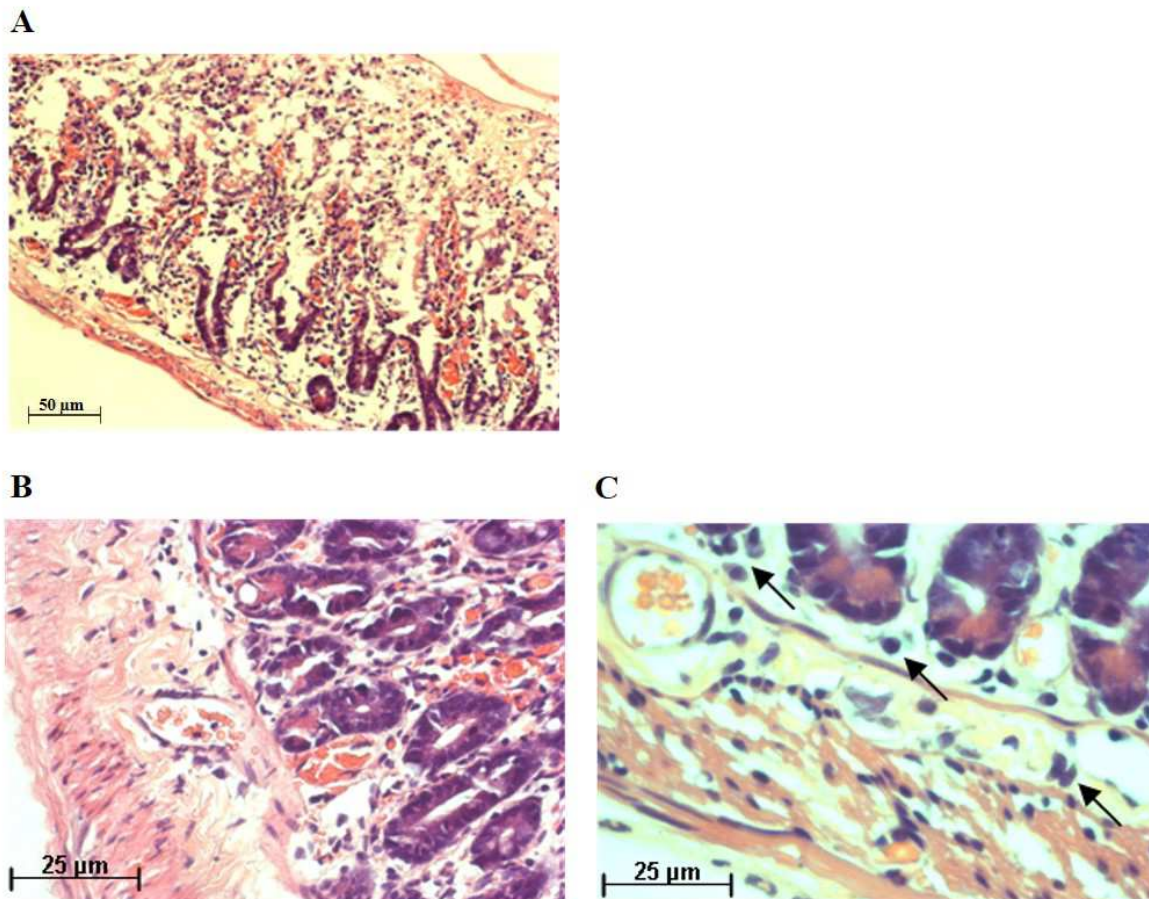


Abb. 7 Histopathologische Veränderungen nach Schädigung mit IA (1 %). Dargestellt sind exemplarische H&E-Schnitte von perfundierten Darmsegmenten mit Auflösung der regelmäßigen Zotten- und Kryptenarchitektur und Einblutungen in die Mukosa (A) und Submukosa (B) und Infiltration von Neutrophilen (C, Pfeil).

Mithilfe eines modifizierten Entzündungsscores nach Satoh et al. (1997) wurden die histologischen Veränderungen anschließend beurteilt. Aufgrund der kurzen Perfusionsdauer konnten Veränderungen nur innerhalb der Mukosa beobachtet werden. Deshalb wurde die apikale sowie basale Mukosa hinsichtlich der drei Parameter: gefüllte Blutgefäße (**Hyperämie**), Einblutungen in das Gewebe (**Hämorrhagie**) und nekrotische Zellen (**Nekrose**) analysiert (Abb. 8).

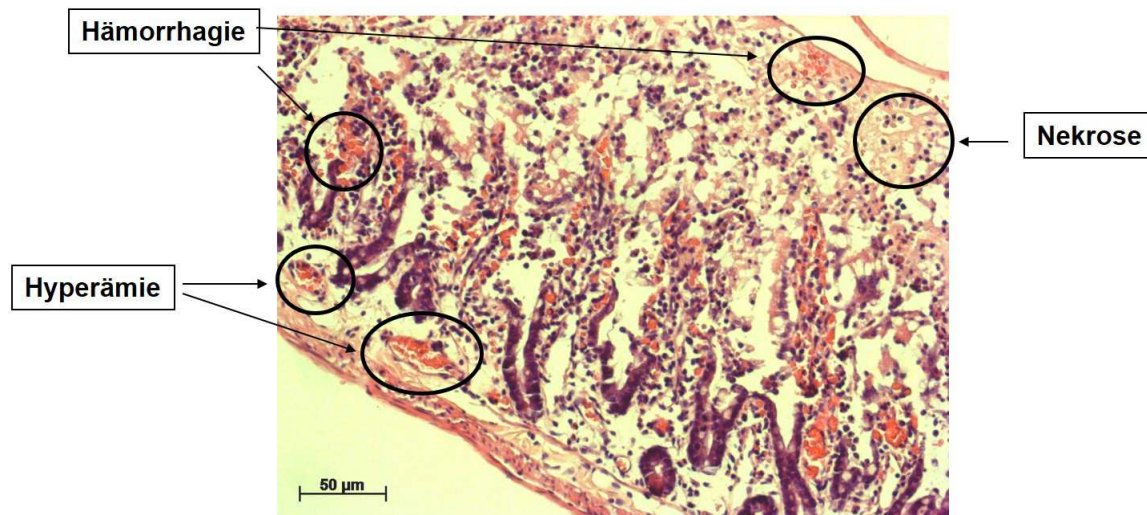


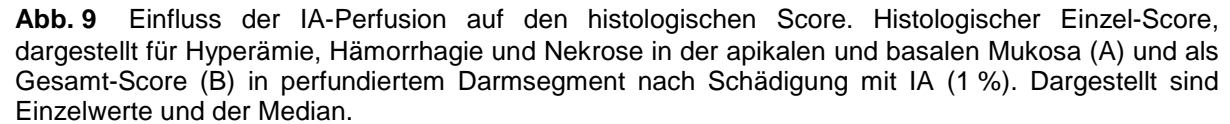
Abb. 8 Darstellung der histologischen Entzündungs-Parameter an einem exemplarischen HE-Schnitt eines perfundierten Dünndarmsegmentes nach IA-Schädigung.

Je nach Schwere der einzelnen Parameter wurden Punkte von 0 bis 3 vergeben (Tab. 4). Die Punkte für die einzelnen Parameter wurden addiert und ergaben den histologischen Gesamt-Score. Dabei wird eine schwerwiegende Entzündung durch einen hohen Score-Wert abgebildet. Im Falle der Wirksamkeit eines Therapeutikums ist dieser Wert proportional zur Wirkung erniedrigt. Der histologische Score wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie zusammengefasst. Die Beurteilung hinsichtlich des Schweregrades erfolgte immer an verblindeten H&E-gefärbten Gewebeschnitten. In regelmäßigen Abständen wurde eine Auswahl von Proben doppelt begutachtet.

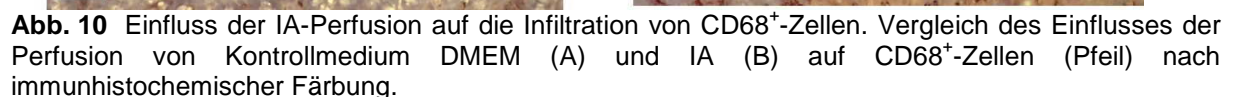
Tab. 4 Parameter für den histologischen Entzündungs-Score, modifiziert nach Satoh et al. [173].

Mukosa apikal			Mukosa basal		
Hyperämie	Hämorrhagie	Nekrose	Hyperämie	Hämorrhagie	Nekrose
- negative, ± minimal, + mild, ++ moderate, +++ schwer (0-3 Punkte, max 18 Punkte)					

Die beobachteten histopathologischen Veränderungen in der IA-Gruppe konzentrieren sich vor allem in der apikalen Mukosa und resultierten besonders für die Parameter Hyperämie und Nekrose in erhöhten Score-Werten von durchschnittlich 2,3 und 1,8. Der Parameter Hämorrhagie hatte durchschnittlich 1,3 Punkte. In der basalen Mukosa war nur der Hyperämie-Score erhöht auf durchschnittlich 1,0 (Abb. 9A). Der histologische Gesamt-Score für IA-geschädigte Darmsegmente lag bei durchschnittlich 6,58 Punkten (Abb. 9B).



Die intestinale Entzündung ist unter anderem durch die Infiltration von Immunzellen wie Makrophagen und T-Lymphozyten in das entzündete Gewebe charakterisiert [220, 221, 94]. Um zu ermitteln, ob die IA-Perfusion in eine erhöhte Migration von Immunzellen aus den vaskulären Strukturen resultierte, wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Zur genaueren Charakterisierung der Zellinfiltrate in das perfundierte Darmgewebe wurden Antikörper gegen CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten sowie CD68⁺-Makrophagen verwendet. Die Abbildung 10 zeigt, dass nach Perfusion mit DMEM nur wenig CD68⁺-Zellen nachweisbar waren, während es nach IA-Perfusion zu deren Zunahme im Darmgewebe kam. Für die T-Lymphozyten-Population konnten keine Unterschiede zwischen Kontrollmedium und IA nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).



4.1.3.3 Expression von Targetgenen

Um zu ermitteln, ob die Perfusion mit Iodoacetamid die Expression von ausgewählten Targetgenen beeinflusst, wurden die perfundierten Darmsegmente hinsichtlich der Expression des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6, des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10, des Chemokins MCP-1 und des defence-Faktors intestinale alkalische Phosphatase (iAP) analysiert. In Abbildung 11 ist die relative Änderung der Gen-Expressionen unter IA-Perfusion im Vergleich zur ungeschädigten Kontrollgruppe (DMEM) dargestellt. Die Perfusion mit IA resultierte für IL-6 im stärksten Anstieg um das 4,7-Fache. Die Expression von IL-10 und MCP-1 war um das 2,5- und 3,4-Fache erhöht, während die iAP um das 0,026-Fache vermindert exprimiert war.

Für alle vier untersuchten Targetgene konnte eine signifikante Steigerung beziehungsweise Reduktion der Expression unter der IA-induzierten Entzündung nachgewiesen werden ($p < 0,05$).

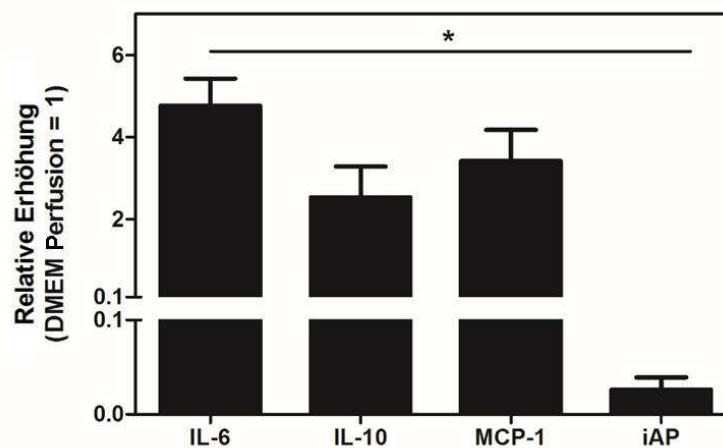


Abb. 11 Einfluss der IA-Perfusion auf die Expression von Targetgenen. Relative Expressionserhöhung der mRNA von IL-6, IL-10, MCP-1 und iAP im perfundierten Darmsegment nach Schädigung mit IA (1 %). Die Expression der jeweiligen Gene wurde zum Referenzgen HPRT normalisiert und zur Kontrollgruppe (DMEM) dargestellt. Dargestellt sind die MW \pm SEM (n = 6 pro Gruppe). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. * $p < 0,05$ vs. DMEM.

Um zu beurteilen, ob die Perfusion mit IA-Einfluss auf das umliegende Darmgewebe hat, wurden zum Versuchsende Gewebeproben proximal und distal vom perfundierten Segment entnommen und hinsichtlich der Histopathologie sowie der Expression der pro-inflammatorischen Targetgenen IL-6 und MCP-1 analysiert. Abbildung 12A zeigt einen H&E-gefärbten Schnitt einer proximalen und distalen Kontrolle von einem mit IA-perfundierten Versuchstier. Im Vergleich zu Abbildung 7 zeigte sich von apikal nach basal eine relativ normale Darmstruktur mit regelmäßigen Krypten und Zotten und ohne entzündliche Zellinfiltrate. Lediglich im distalen Teil war ein leichter Verlust von Becherzellen im oberen Drittel der Zotten zu erkennen.

In der Abbildung 12B ist die relative Expression der pro-inflammatorischen Gene IL-6 und MCP-1 in proximalen und distalen Abschnitt sowie im direkt perfundierten Darmsegment dargestellt. Im Vergleich zur relativen Expression im perfundierten Darmsegment wurden für beide Targetgene signifikant verminderte Expressionen im proximalen und distalen Abschnitt gemessen ($p < 0,01$ vs. IA). Die IL-6 Expression war proximal auf durchschnittlich $0,012 \pm 0,002$ und distal auf durchschnittlich $0,034 \pm 0,005$ vermindert. Für die MCP-1 Expression konnte sowohl proximal als auch distal ein ähnliches Expressionsniveau von $0,34 \pm 0,06$ und $0,34 \pm 0,15$ gemessen werden.

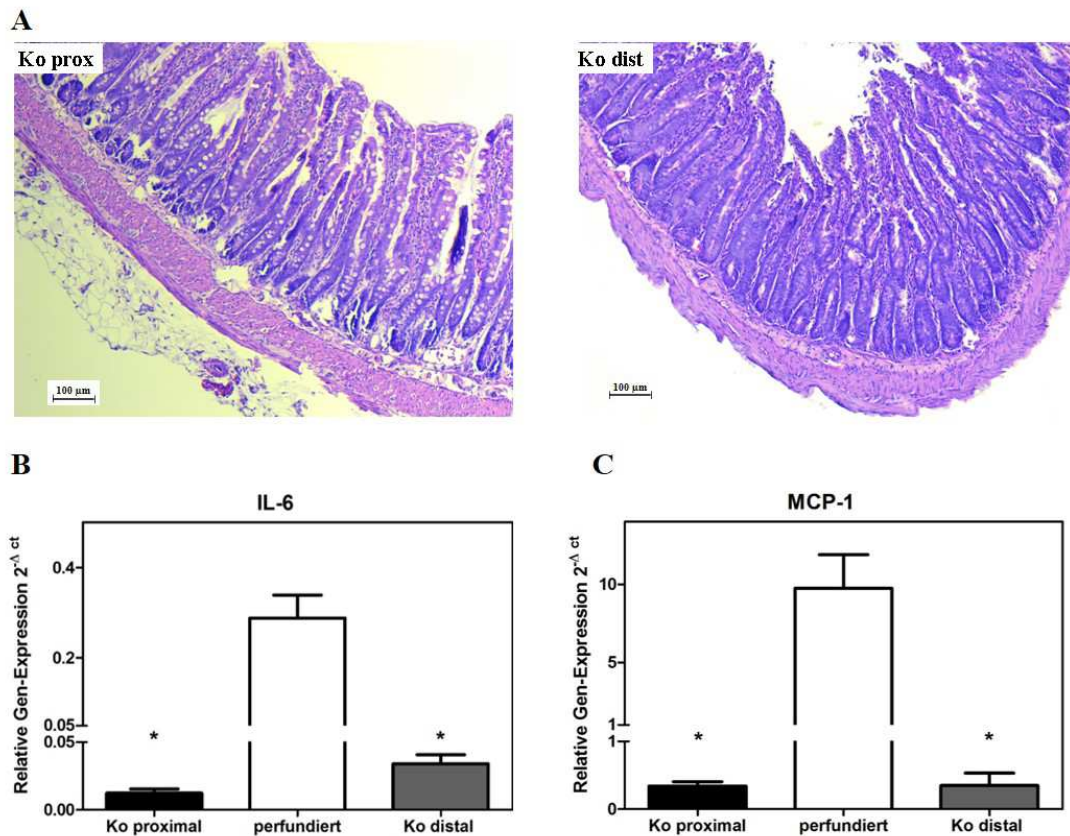


Abb. 12 Einfluss der IA-Perfusion auf die Histologie (A) und die Expression von IL-6 und MCP-1 (B) in proximalen und distalen Kontroll-Gewebeproben (Ko). Vergleich des Einflusses der Perfusion von IA auf die Histopathologie des Dünndarms proximal und distal vom perfundierten Darmsegment (A) und die relative Genexpression von IL-6 und MCP-1 normalisiert zum Referenzgen HPRT (B). Dargestellt sind die MW \pm SEM ($n = 4-10$ pro Gruppe). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. * $p < 0,01$ vs. perfundiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Perfusion eines definierten Darmsegmentes mit IA keinen Einfluss auf die Histologie sowie das Expressionsverhalten von IL-6 und MCP-1 im umliegenden proximalen und distalen Gewebe hatte. Somit beschränkte sich die IA-induzierte Entzündung lediglich auf das perfundierte Darmsegment.

4.2 Effekte verschiedener Therapeutika auf die IA-induzierte mukosale Entzündung

Nach erfolgter Etablierung des Kurzzeitschädigungsmodells konnte dieses Modell zur Evaluierung von Therapeutika angewendet werden. Zu Beginn wurde der Einfluss von CU-relevanten Therapeutika auf die induzierte Entzündung genauer analysiert. Dafür wurden das Kortikosteroid Dexamethason als Vertreter der konventionellen Therapiebehandlung und das Probiotikum Mutaflor als Vertreter der alternativen Therapiestrategie eingesetzt. Mit Dexamethason werden moderate bis hochgradig aktive CU behandelt. Mutaflor ist eine Alternative zur Standardmedikation Mesalazin bei der remissionserhaltenden Therapie von CU-Patienten. Ein innovativer Ansatz in der CU-Therapie ist der Einsatz von Tonmineralien, welche in der Humanmedizin besonders für ihre gute Wirksamkeit und Verträglichkeit bei Durchfallerkrankungen bekannt sind. Deshalb erfolgte im Kurzzeitschädigungsmodell die Evaluierung des Tonminerals Resormin, welches erstmalig auf sein therapeutisches Potential und somit als CU-Therapieoption getestet wurde.

4.2.1 Die Perfusion mit den Therapeutika führte zur einer Reduktion der IA-induzierten histologischen Veränderungen

Die mikroskopische Auswertung der Histologie ergab in den drei Therapiegruppen ein ähnliches Bild. Im Vergleich zur IA-Gruppe (Abb. 13A) fiel die induzierte Schädigung im Darmsegment durch die anschließende Perfusion mit einem der drei Therapeutika weniger stark aus. Für alle drei Therapiegruppen zeigte sich eine regelmäßige Krypten- und Zottenarchitektur. Die perfundierten Segmente aus der IA+Mutaflor-Gruppe zeigten apikal vermehrt nekrotische Zellen, leicht beschädigte Zottenspitzen („Tipp lesions“) und Einblutungen sowie eine verminderte Anzahl von Becherzellen (Abb. 13B). Bei der therapeutischen Perfusion von Dexamethason waren apikal wenige nekrotische Zellen und Einblutungen vorhanden (Abb. 13C). Die geringsten histopathologischen Veränderungen waren in der IA+Resormin-Gruppe zu finden. Hier zeigten sich apikal nur minimale Einblutungen in die Mukosa (Abb. 13D).

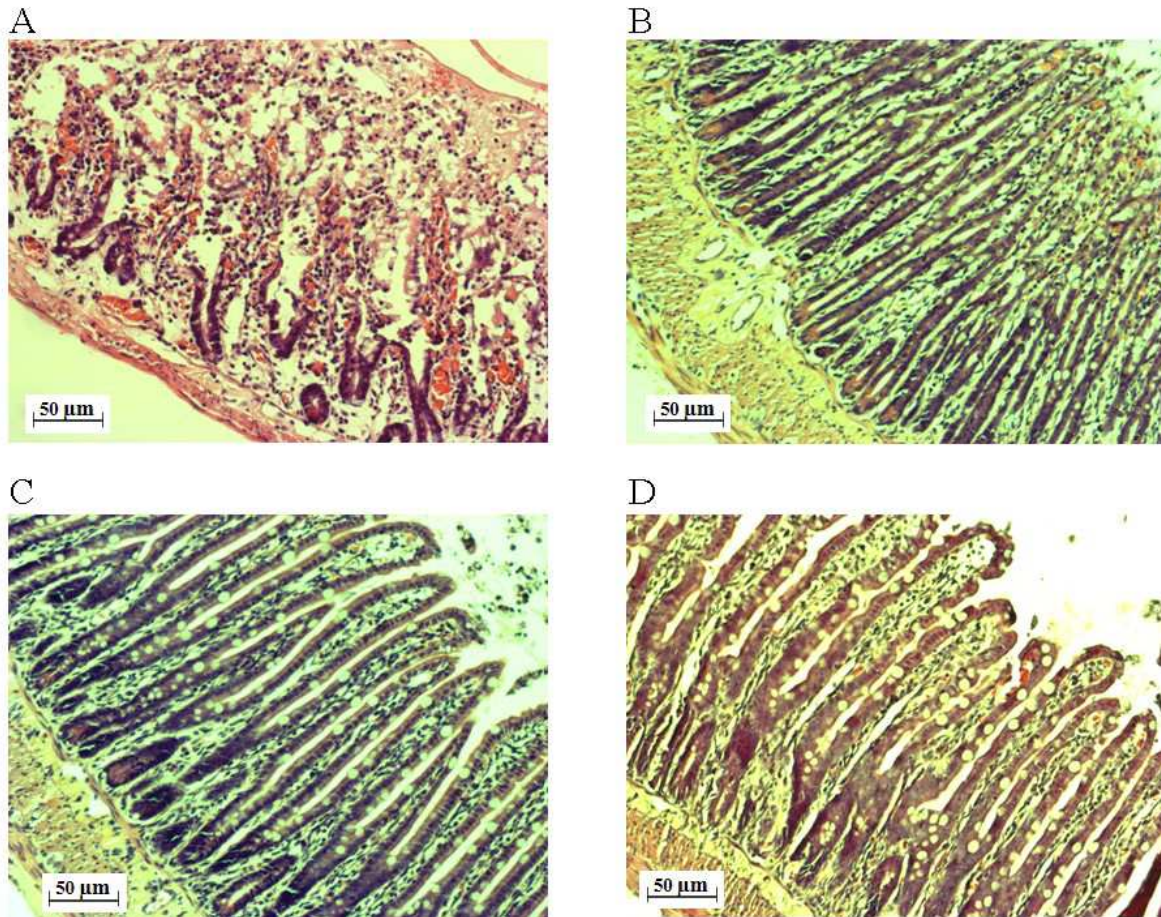


Abb. 13 Einfluss der Therapie-Perfusion auf die Histologie. Repräsentative histologische Schnitte von *in situ*-perfundierten Dünndarmsegmenten der vier Versuchsgruppen. Dargestellt sind die histopathologische Veränderungen nach Schädigung mit IA (1 %) (A); IA + Mutaflor (B); IA + Dexamethason (C) und IA + Resormin (D).

Die histologische Auswertung der HE-Schnitte nach dem modifizierten Score nach Satoh et al. hinsichtlich der Entzündungsparameter bestätigte die mikroskopischen Befunde. Für alle Therapiegruppen wurden im Vergleich zur IA-Gruppe niedrigere Werte im Einzel-Score ermittelt (Abb. 14A). In der Mukosa apikal erreichten die Therapiegruppen Mutaflor, Dexamethason und Resormin für den Parameter Hyperämie Durchschnittswerte von 1,3; 1,1 beziehungsweise 0,6 Punkte, für den Parameter Hämorrhagie Durchschnittswerte von 0,6; 0,5 beziehungsweise 0,2 Punkte und für den Parameter Nekrose Durchschnittswerte von 0,8; 0,6 beziehungsweise 0,5 Punkte. In der Mukosa basal waren nur Unterschiede im Parameter Hyperämie zu ermitteln mit Durchschnittswerten von 0,3; 0,1 beziehungsweise 0,2 Punkten. Im Gesamt-Score wurden für alle Therapiegruppen signifikant geringere Werte ermittelt ($p < 0,05$), (Abb. 14B). Die Therapiegruppen zeigten dabei Mittelwerte von 3,0 (Mutaflor) und 2,5 (Dexamethason). Der geringste histologische Gesamt-Score im Vergleich zu untherapierten Ratten wurde mit 1,6 in der mit Resormin behandelten Gruppe erreicht. Die histologischen Ergebnisse zeigen, dass alle drei Therapeutika einen positiven Einfluss auf die induzierte Entzündung vermitteln und das histologische Gesamtbild des perfundierten Darmsegments verbessern, was sich in einem niedrigeren histologischen Einzel- als auch Gesamt-Score widerspiegelte.

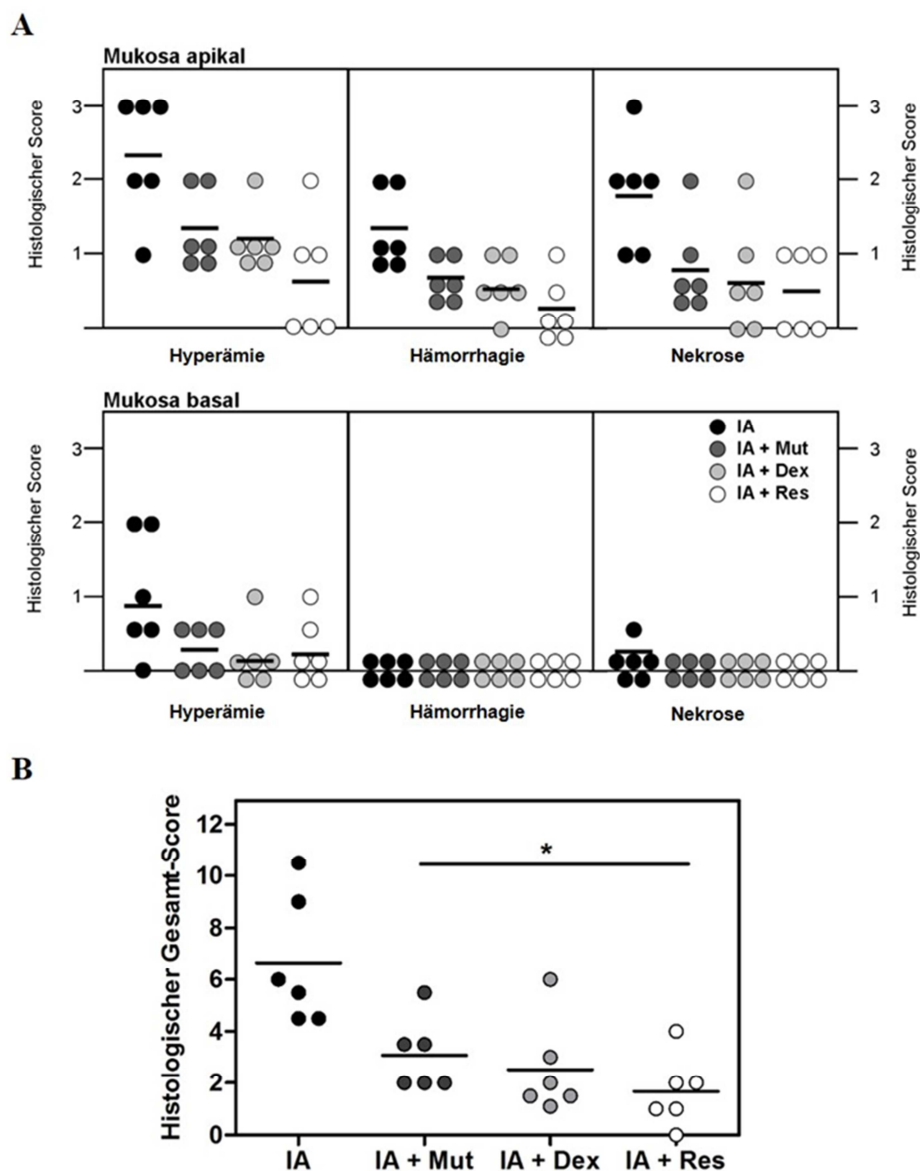


Abb. 14 Einfluss der Therapie-Perfusion auf den histologischen Score. Histologischer Score dargestellt als Einzel-Score für Hyperämie, Hämorrhagie und Nekrose in der apikalen und basalen Mukosa (A) und Gesamt-Score (B) von perfundierten Darmsegmenten in den vier experimentellen Gruppen ohne Therapie (IA) sowie nach Therapie mit Mutaflor (Mut), Dexamethason (Dex) und Resormin (Res); n = 6. Dargestellt sind Einzelwerte und der Median, Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. * p < 0,05 vs. IA.

4.2.2 Die Perfusion mit den Therapeutika führte zur einer geringen Abnahme der IA-induzierten CD68⁺-Zell-Infiltration

Tendenziell zeigte sich ein ähnliches Immigrationsverhalten der CD68⁺-Zellen in das perfundierte Darmsegment (Abb. 15). Signifikante Änderungen wurden nicht gefunden, lediglich eine geringe Abnahme von CD68⁺-Zellen konnte nach therapeutischer Perfusion mit Mutaflor, Dexamethason und Resormin beobachtet werden.

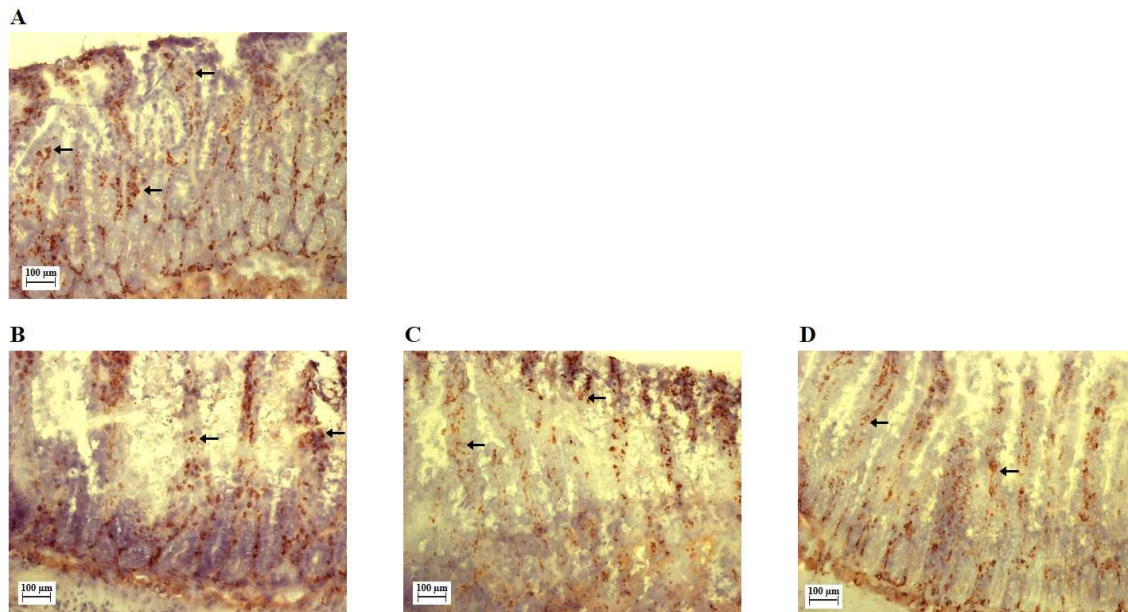


Abb. 15 Einfluss der Therapie-Perfusion auf die Infiltration von CD68⁺-Zellen. Repräsentative immunhistochemische Färbungen von *in situ*-perfundierten Dünndarmsegmenten der vier Versuchsgruppen IA (1 %) (A); IA + Mutaflor (B); IA + Dexamethason (C) und IA + Resormin (D).

4.2.3 Die Perfusion mit den Therapeutika verringerte die IA-induzierte mRNA-Expression von IL-6, IL-10, MCP-1 und iAP positiv

Zur näheren Charakterisierung der eingesetzten Therapeutika und deren Wirkung wurden ausgewählte Targetgene im perfundierten Darmsegment mithilfe der Real-Time-PCR untersucht und ihre Expression mit der untherapierten IA-Gruppe verglichen. In Abbildung 16A ist die relative Erhöhung von IL-6, IL-10 und MCP-1 aller vier Versuchsgruppen dargestellt. Sowohl nach therapeutischer Behandlung mit Mutaflor als auch mit Dexamethason konnte eine verminderte IL-6-, IL-10- und MCP-1-Expression auf mRNA-Ebene im Vergleich zur untherapierten IA-Gruppe gemessen werden. IL-6 war in der Mutaflor- Gruppe um das 2,0-Fache ($p < 0,05$ vs. IA) und in der Dexamethason- Gruppe um das 1,5-Fache vermindert exprimiert. Die relative Genexpression von IL-10 war nach Mutaflor um das 1,6-Fache und nach Dexamethason um das 1,5-Fache vermindert. Eine signifikante Verminderung um das 2-Fache für Mutaflor ($p < 0,05$ vs. IA) und um das 4,5-Fache für Dexamethason ($p < 0,05$ vs. IA) wurde für die relative MCP-1-Expression ermittelt. Die therapeutische Perfusion mit Resormin zeigte ein differenzierteres Expressionsbild der Targetgene. Sowohl die relative IL-6- als auch die relative IL-10-Expression stieg um das

3,1-Fache und 2,0-Fache, während die MCP-1-Expression um das 426,2-Fache sank ($p < 0,05$ vs. IA). Die Expression der iAP war unter Mutaflor-, Dexamethason- und Resormin-Therapie weniger stark vermindert exprimiert im Vergleich zur untherapierten IA (Abb. 16B). Dabei führte die therapeutische Perfusion von Dexamethason zum signifikant geringsten Expressionsabfall ($p < 0,05$ vs. IA).

Insgesamt konnte durch die therapeutische Perfusion das Expressionsprofil der untersuchten Targetgene zum größten Teil positiv beeinflusst werden.

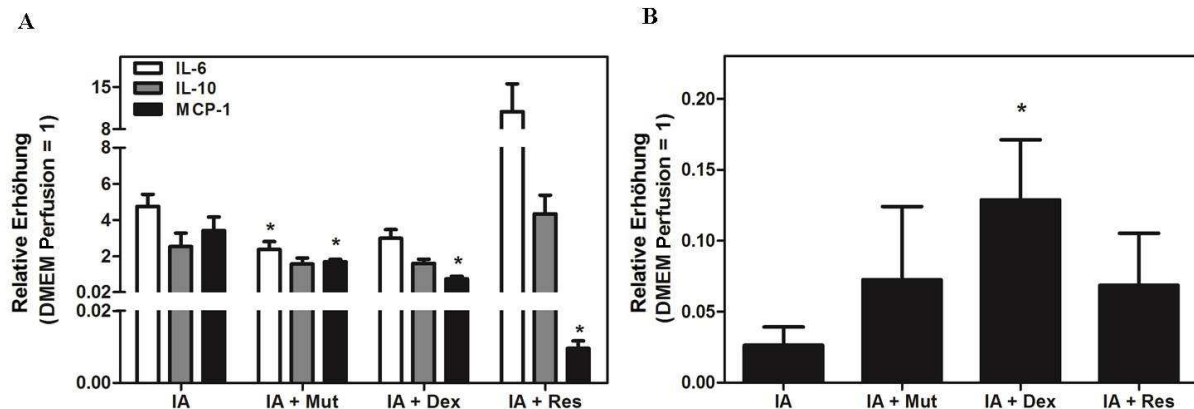


Abb. 16 Einfluss der Therapie-Perfusion auf die Expression von Targetgenen. Relative Expressionserhöhung der mRNA von IL-6, IL-10 und MCP-1(A) und iAP (B) im perfundierten Darmsegment der vier Versuchsgruppen IA, IA + Mut, IA + Dex und IA + Res. Die Expression der jeweiligen Gene wurde zum Referenzgen HPRT normalisiert und relativ zur Kontrollgruppe (DMEM) abgebildet. Dargestellt sind die MW \pm SEM ($n = 6$ pro Gruppe). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. * $p < 0,05$ vs. IA.

4.3 Untersuchungen zu den molekularen Wirkmechanismen der Tonmineralien

Im Kurzzeitschädigungsmodell konnte durch die therapeutische Applikation von Resormin positive Effekte auf die induzierte Entzündung im Darmsegment vermittelt werden. Dies zeigte sich insbesondere im signifikant verminderten histologischen Score. Auch die MCP-1 mRNA-Expression war signifikant reduziert, während IL-6 und IL-10 vermehrt exprimiert wurden. Um den therapeutischen Effekt des Resormins im Kurzzeitschädigungsmodell besser zu verstehen und mögliche zugrundeliegende molekulare Mechanismen aufzuklären, erfolgten weitere Analysen mithilfe humaner Epithelzelllinien. Der Schwerpunkt in den folgenden *in vitro*-Arbeiten war die Analyse der Wirkung von Tonmineralien auf Epithelzellen, welche entweder unter physiologischen oder pro-inflammatorischen Bedingungen kultiviert wurden. Zum Einsatz kamen die Epithelzelllinien Caco-2 und SW480, welche sich in ihrem Differenzierungsgrad und ihrer Reaktivität gegenüber pro-inflammatorische Stimuli unterscheiden. Caco-2-Zellen erreichen im Zuge ausreichender Kultivierung den Status einer vollständig ausdifferenzierten Epithelzelle und sind wenig sensitiv. SW480-Zellen dagegen sind nur moderat differenziert und reagieren um ein Vielfaches sensitiver. Die Verwendung beider Zelllinien erlaubte zum einen die Analyse der Wirkung von Tonmineralien auf robuste

und empfindliche Epithelzellen. Zum anderen konnten mögliche therapeutische Wirkmechanismen in undifferenzierten und differenzierten Epithelzellen verglichen werden.

Die Inkubation der Zellen erfolgte mit Resormin und zwei weiteren Tonsuspensionen. Das Resormin gehört zur Klasse der Dreischicht-Silikate. Aufgrund des hohen Wasseraufnahmevermögens und der Ionenaustauschkapazität wird Resormin sowohl für kosmetische Anwendungen als auch für die therapeutische Behandlung von Durchfall- und Refluxerkrankungen eingesetzt. Im Zuge weiterer Verarbeitungsprozesse konnte das Resormin mit einer Ausgangsgröße von $< 15 \mu\text{m}$ noch feiner gemahlen und funktionslose, nicht-quellfähige Nichttonminerale abgereichert werden. Die dabei entstandenen Tonminerale $< 5 \mu\text{m}$ und $< 2 \mu\text{m}$ zeichneten sich durch eine vergrößerte Oberfläche, neu geschaffene Bruchkanten und vermehrte Bindungsstellen aus. Ob diese Modifikationen auch in einem verbesserten therapeutischen Effekt resultieren, sollte in den *in vitro*-Untersuchungen analysiert werden.

4.3.1 Untersuchungen zur Toxizität von Friedländer Mineral-Silikaten

Ein wesentliches Kriterium für den Einsatz des Friedländer Tonminerals im humanen System ist eine Unbedenklichkeitsuntersuchung bezüglich der Toxizität. Tonminerale sind mit Umweltkeimen kontaminiert, da es sich um ein sehr altes Naturmaterial handelt, welches heute aus tiefen Bodenschichten geborgen wird. In einer mikrobiellen Untersuchung konnte eine Ausgangskeimbelastung mit *Pseudomonas stutzeri*, *Acinetobacter Iwoffii*, Fusarium-Spezies und anderen aeroben Sporenbildner nachgewiesen werden. Nach Sterilisation der Tonsuspensionen war kein Wachstum von Bakterien und Pilzen nachweisbar. Jedoch können Lipopolysaccharide durch eine Sterilisation nicht inaktiviert werden und können weiterhin als pro-inflammatorische Stimuli in der Suspension vorliegen.

Deshalb wurden die Zelllinien Caco-2 und SW480, welche etablierte Modelle für humane Darmepithelzellen darstellen, mit unterschiedlichen Tonkonzentrationen über verschiedene Zeiträume inkubiert und anschließend die Proliferation bzw. die Vitalität der behandelten Zellen im Vergleich mit unbehandelten Kontrollzellen untersucht.

Als Proliferationsassay wurde der kolorimetrische 5-Brom-2-desoxyuridin-Test verwendet. Das Prinzip dieser Methode ist der Einbau des Pyrimidinanalogons 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) anstelle der Base Thymidin in neusynthetisierte DNA von Zellen.

Im BrdU-Test zeigte sich ein relativ gleichmäßiges Ergebnis für beide Zelllinien mit minimalen Abweichungen zur unbehandelten Kontrolle. Die Caco-2-Zellen (Abb. 17A) verzeichneten nach 24 Stunden einen leichten Anstieg der Proliferationsrate, welcher sich nach 48 Stunden Co-Inkubation weitestgehend normalisierte und die Werte mit 109,1 % ($< 15 \mu\text{m}$), 110,8 % ($< 5 \mu\text{m}$) und 113,4 % ($< 2 \mu\text{m}$) nur geringfügig über unbehandelten Kontrollzellen lagen.

Die Inkubation der SW480-Zellen mit $< 15 \mu\text{m}$ und $< 5 \mu\text{m}$ für 24 Stunden hatte einen zu vernachlässigenden Einfluss auf die Proliferationsrate. Lediglich unter Koinkubation mit $< 2 \mu\text{m}$ wurde ein geringer Anstieg der Proliferation gemessen (Abb. 16B). Nach 48 Stunden Inkubation mit $< 15 \mu\text{m}$ oder $< 2 \mu\text{m}$ war der Einfluss auf die Proliferationsrate mit durchschnittlich 102,2 % beziehungsweise 95,2 % zu vernachlässigen, während die Proliferationsrate für $< 5 \mu\text{m}$ auf 78,2 % sank, verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen.

Zusammenfassend wurde die Proliferation beider Zelllinien durch die Koinkubation mit den Tonsuspensionen nicht wesentlich beeinflusst. Nur vereinzelt konnten kleine Unterschiede in der proliferativen Aktivität nachgewiesen werden, welche jedoch nicht gleichzeitig in beiden Zelllinien auftraten.

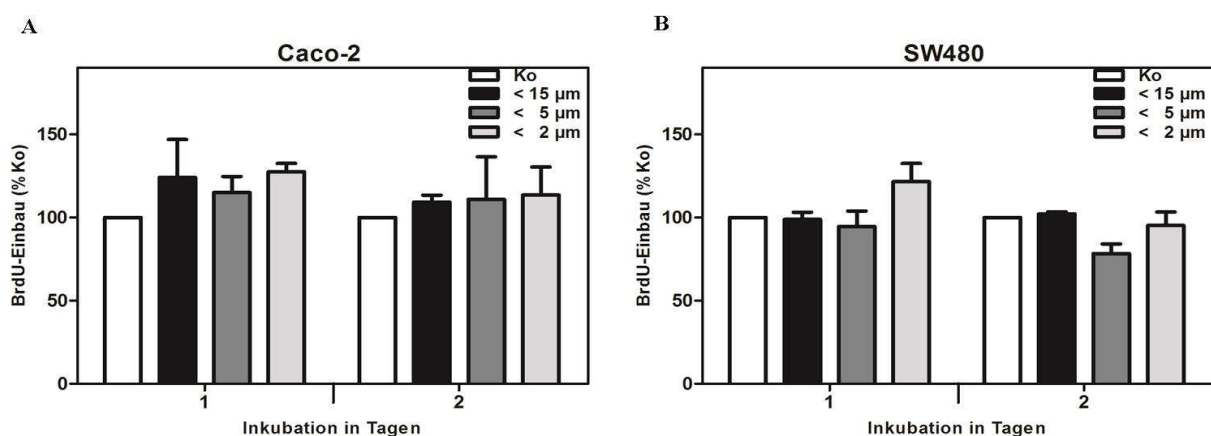


Abb. 17 Effekte von Tonsuspensionen auf die Zellproliferation von Caco-2 (A) und SW480 (B). Darstellung des BrdU-Einbaus der Caco-2- und SW480-Zellen in %-Relation zur unbehandelten Kontrolle (Ko). Nach Inkubation über 24 und 48 Stunden mit den Tonsuspensionen $< 15 \mu\text{m}$, $< 5 \mu\text{m}$ oder $< 2 \mu\text{m}$ erfolgte ein 24-stündiger Einbau des BrdU-Labels mit anschließendem kolorimetrischen Nachweis. Dargestellt sind MW \pm SEM ($n = 3$).

Zum Nachweis der Vitalität der Zellen wurde der 4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen-disulfonat-(WST-)Test verwendet. Hierbei wird die metabolische Aktivität von lebenden Zellen durch Bestimmung der mitochondrialen Aktivität mithilfe des Tetrazolimsalzes WST-1 nachgewiesen. Die Zellvitalität der Caco-2-Zellen reduzierte sich durch die Koinkubation in Abhängigkeit von der Kulturdauer auf 51,5 % ($< 15 \mu\text{m}$), 57,9 % ($< 5 \mu\text{m}$) und 83,9 % ($< 2 \mu\text{m}$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 18A).

Die Zelllinie SW480 zeigte durch die Koinkubation einen weniger stark reduzierten Abfall der metabolischen Aktivität als die Caco-2-Zellen in Abhängigkeit von der Kulturdauer. Nach 48 Stunden sank die Zellvitalität auf 75,8 % ($< 15 \mu\text{m}$), 71,3 % ($< 5 \mu\text{m}$) und 66,3 % ($< 2 \mu\text{m}$) verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 18B).

Insgesamt konnten nach 24-stündiger Inkubation der Epithelzellen mit den drei Tonsuspensionen keine nennenswerten Zellvitalitätsverluste gemessen werden. Erst eine längere Inkubation über 48 Stunden führte zur Beeinträchtigung der Zellvitalität in den Caco-2-Zellen.

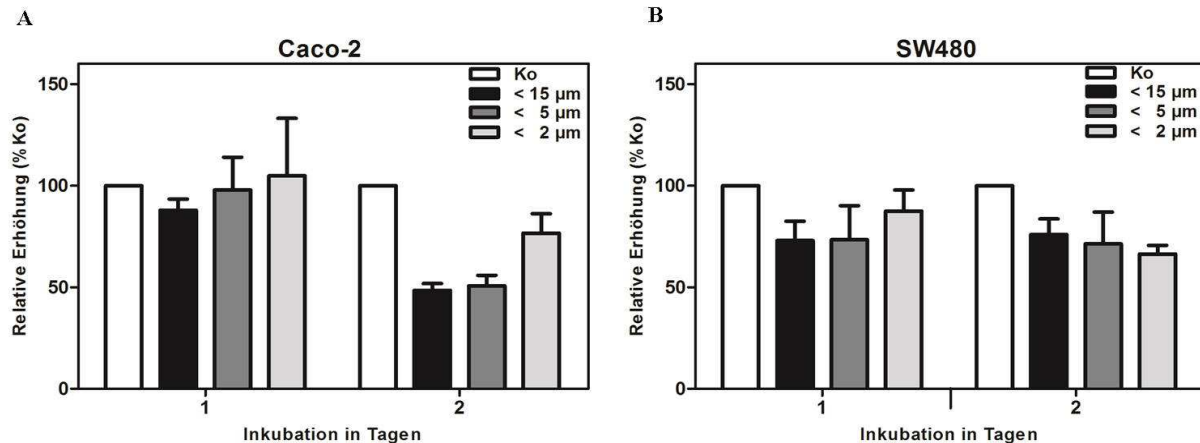


Abb. 18 Effekte von Tonsuspensionen auf die Zellvitalität von Caco-2 (A) und SW480 (B). Darstellung der Zellvitalität der Caco-2- und SW480-Zellen in %-Relation zur unbehandelten Kontrolle (Ko). Nach Inkubation über 24 und 48 Stunden mit den Tonsuspensionen < 15 µm, < 5 µm oder < 2 µm wurde die Zellvitalität mittels WST-1 bestimmt. Dargestellt sind MW ± SEM (n = 2).

4.3.2 Untersuchung zur Wirkung von Friedländer Tonmineralien auf die Expression von Zytokinen

Ein weiteres Kriterium für den Einsatz von Friedländer Tonmineralien als Therapeutikum war neben dem nicht-vorhandenen Toxizitätspotential der Ausschluss eines pro-inflammatorischen Potentials. Dafür wurden unstimulierte Epithelzellen mit den Tonsuspensionen koinkubiert, um auszuschließen, dass die Silikate selbst einen pro-inflammatorischen Stimulus darstellen.

Ein weiteres Untersuchungskriterium war die mögliche Fähigkeit von Tonmineralien, Zytokine zu binden. Dieser Wirkmechanismus könnte dem Therapieerfolg im Kurzzeitschädigungsmodell zugrunde liegen. Denn ein Charakteristikum für die CU ist der Zytokin-Sturm, der dauerhaft die Epithelzellen und das darunterliegende GALT stimuliert. Einen weiteren Stimulus stellt die Exposition der Epithelzellen durch luminale Antigene dar. Als Folge dieser dauerhaften Stimulation werden weitere Zytokine exprimiert und sezerniert und resultieren in einer Chronifizierung der Entzündung.

Zur Darstellung der humanen Situation wurden *in vitro* Caco-2- und SW480-Zellen über Nacht mit einem Zytokin-Cocktail (ZC) bestehend aus IL1β (25 ng/ml), TNFα (50 ng/ml), IFNγ (50 ng/ml) und dem Endotoxin LPS E.coli (10 ng/ml) stimuliert. Für diese Mediatoren ist bekannt, dass sie unter Entzündung im Darm vermehrt vorliegen. Als Reporter fungierten die Expressionslevel der Zytokine IL-8 und MCP-1 in den Epithelzellen, welche nur in sehr geringen Mengen in ruhenden Zellen gebildet werden. Zellulärer Stress, ausgelöst durch pro-inflammatorische Zytokine sowie bakterielle und virale Produkte, führt zu einer raschen und starken Expression dieser Zytokine [222]. Die Expression von IL-6 und IL-10, welche als Reporter im perfundierten Darm des Kurzzeitschädigungsmodells fungierten, erwies sich in der Zellkultur als ungeeignet. Für IL-6 konnte in beiden Zelllinien unabhängig vom Stimulationsstatus nur eine sehr geringe mRNA-Expression mit Δc_T -Werten zwischen 18–20

nachgewiesen werden. Für IL-10 konnten Zhang Y et al. in unstimulierten SW480 erhöhte Proteinmengen nachweisen [223]. Jedoch zeigten Sergent T et al. für Caco-2-Zellen, dass diese nur sehr geringe Mengen von IL-10 exprimieren und nach ZC + LPS-Stimulation kein nennenswerter Anstieg messbar war [224].

Die Δc_T -Werte von IL-8 und MCP-1 dagegen lagen zwischen 3 und 15, was für eine verstärkte mRNA-Expression sprach. Des Weiteren zeigte sich ein deutlich messbarer Expressionsunterschied zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen. Deshalb wurden in den folgenden Zellkulturversuchen die Expressionsänderung von IL-8 und MCP-1 untersucht.

Eine Änderung der IL-8- und MCP-1-Expressionslevel während der Koinkubation mit den Tonsuspensionen, erlaubte eine Aussage über das mögliche Zytokin-Binde-Potential durch die Tonmineralien.

Im Vergleich zur Kontrolle induzierte der ZC + LPS in beiden Zelllinien eine deutliche IL-8 und MCP-1-Expression, wobei die Expressionsänderung bei den weniger differenzierten SW480 um ein Vielfaches höher ausfiel (Daten nicht dargestellt). In den folgenden Abbildungen ist die Expressionsänderung in den Koinkubationsversuchen immer relativ zu ZC + LPS-stimulierten Zellen ohne Koinkubation dargestellt.

Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse der IL-8- und MCP-1-mRNA-Expression in Caco-2- und SW480-Zellen. Bei ZC + LPS-stimulierten Zellen konnte unter Koinkubation mit den Tonsuspensionen eine geringe Zunahme der IL-8-Expression in Abhängigkeit von der Partikelgröße beobachtet werden. Dieser Anstieg war in den Caco-2-Zellen etwas deutlicher, jedoch für beide Zelllinien nicht signifikant.

Die MCP-1 Expression war bei ZC + LPS-stimulierten Caco-2-Zellen unter $< 15 \mu\text{m}$ und $< 5 \mu\text{m}$ Koinkubation kaum verändert und unter $< 2 \mu\text{m}$ Koinkubation leicht erhöht. In ZC-stimulierten SW480-Zellen resultierte die Koinkubation mit allen drei Tonsuspensionen in einer signifikant verminderten MCP-1 Expression. In beiden Zelllinien resultierte die Inkubation mit den Tonsuspensionen in Abwesenheit vom ZC + LPS in einer kaum veränderten oder stark verminderten IL-8- und MCP-1-Expression.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Tonmineral-induzierte IL-8- und MCP-1-mRNA-Expression in unstimulierten Epithelzellen im Vergleich zu ZC + LPS-stimulierten Zellen zu vernachlässigen war. Somit vermitteln alle drei untersuchten Tonsuspensionen kein pro-inflammatorisches Potential. In ZC + LPS-stimulierten Epithelzellen konnte nur in den SW480-Zellen eine signifikant verminderte MCP-1-Expression durch die Koinkubation mit den drei Tonsuspensionen nachgewiesen werden. Demzufolge kann eine Bindung von Bestandteilen aus dem ZC + LPS durch die Tonmineralien nicht ausgeschlossen werden.

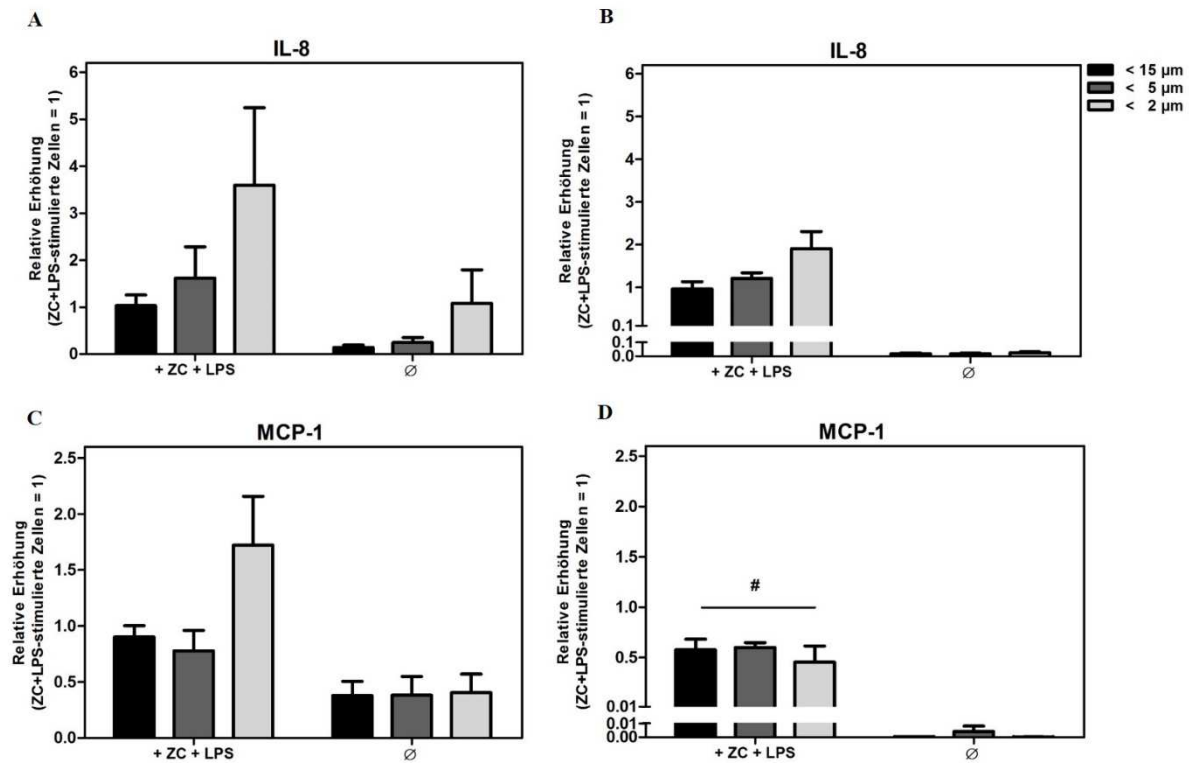


Abb. 19 Effekte von Tonsuspensionen auf die Expression von IL-8 und MCP-1 in Caco-2-Zellen (A + C) und SW480 (B + D). Die Stimulation der Zellen mit dem ZC und dem Endotoxin LPS (IL1 β 25 ng/ml, TNF α 50 ng/ml, IFN γ 50 ng/ml, LPS E.coli 10 ng/ml) über Nacht, mit oder ohne Koinkubation von < 15 μ m, < 5 μ m oder < 2 μ m. Die Expression der jeweiligen Gene wurde zum Referenzgen GAPDH normalisiert und relativ zu den ohne Tonsuspension mit ZC + LPS-stimulierten Zellen dargestellt. Dargestellt sind die MW \pm SEM (n = 5-6 pro Gruppe). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. # p < 0,05 vs. ZC + LPS.

Zusätzlich zu den mRNA-Expressionsanalysen wurde in denselben Versuchsansätzen die IL-8-Protein-Expression untersucht. Die Sekretion von IL-8 in das Zellkulturmedium wurde mittels eines spezifischen ELISAs gemessen und unbehandelten Kontrollzellen mit stimulierten Zellen verglichen.

Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse der sekretierten IL-8-Proteinmengen für Caco-2- und SW480-Zellen. Die Koinkubation mit den drei Tonsuspensionen hatte keinen Einfluss auf die Höhe der IL-8-Sekretion, da diese in den unstimulierten Epithelzellen verglichen mit den Kontrollzellen weder signifikant vermindert noch signifikant erhöht war. In Caco-Zellen (Abb. 20A) führte die ZC + LPS-Stimulation zu einer signifikanten Zunahme der IL-8-Konzentration auf $1154,7 \pm 156,2$ pg/ml (p < 0,05 vs. Ko). Die Koinkubation mit den drei Tonsuspensionen führte zu einer geringen Abnahme von IL-8, welche jedoch nicht signifikant war. Bei SW480-Zellen (Abb. 20B) konnte ebenfalls eine signifikante Steigerung der IL-8-Sekretion in das Kulturmedium auf $1244,6 \pm 198,3$ pg/ml durch den ZC + LPS erzielt werden (p < 0,05 vs. Ko). Die Koinkubation mit < 15 μ m und < 5 μ m führte zu einer Suppression von IL-8, welche jedoch ebenfalls nicht signifikant ausfiel, während < 2 μ m hingegen keinen Einfluss hatte.

Die Ergebnisse zeigen, dass unstimulierte Epithelzellen, welche mit den Tonsuspensionen kokultiviert wurden, ähnlich geringe IL-8-Proteinmengen sezernieren wie die Kontrollzellen. Somit konnte auch auf Proteinebene nachgewiesen werden, dass von den untersuchten Tonmineralien kein pro-inflammatorisches Potential ausgeht. In beiden Zelllinien konnte durch die Stimulation mit dem ZC + LPS ein signifikanter Anstieg der sezernierten IL-8-Proteinmenge induziert werden. Die Kokultivierung mit den Tonsuspensionen führte zu keiner signifikanten IL-8-Reduktion. Demzufolge kann eine IL-8-Bindung durch die Tonmineralien ausgeschlossen werden.

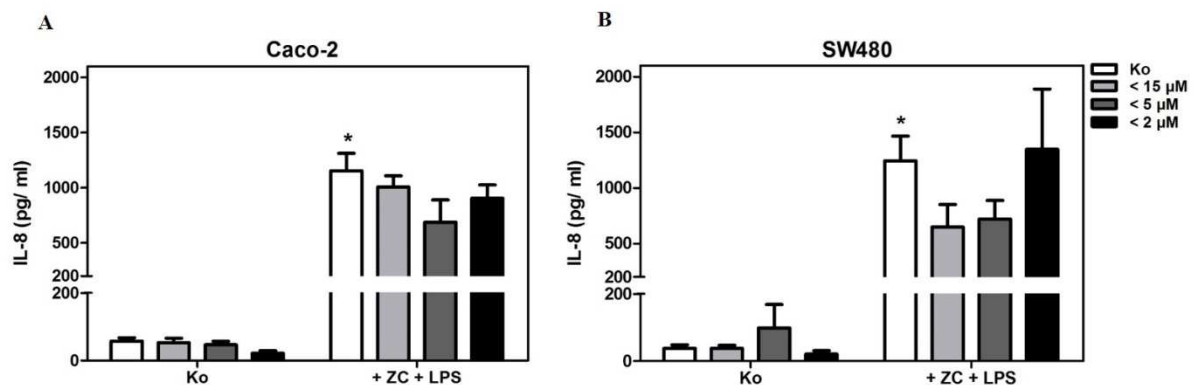


Abb. 20 Effekte von Tonsuspensionen auf die IL-8-Konzentrationen in den Überstand von Caco-2-(A) und SW480-Zellkulturen (B). Die Stimulation der Zellen erfolgte mit dem ZC und dem Endotoxin LPS (IL1 β 25 ng/ml, TNF α 50 ng/ml, IFN γ 50 ng/ml, LPS E.coli 10 ng/ml) über Nacht, mit oder ohne Kokultivierung von < 15 μ m, < 5 μ m oder < 2 μ m. Die in den Zellkultur-Überstand sezernierten Proteine wurden hinsichtlich der IL-8-Proteinmenge mit einem spezifischen ELISA nachgewiesen. Dargestellt sind die MW \pm SEM (n = 4-5 pro Gruppe). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. * p < 0,05 vs. Ko ohne Tonsuspension.

4.3.3 Untersuchungen zur Wirkung von Friedländer Mineral-Silikaten auf die epitheliale Barriere

Ein weiterer Wirkmechanismus, der dem therapeutischen Effekt im Kurzzeitschädigungsmodell zugrunde liegen könnte, ist die Beeinflussung der epithelialen Barriere. Der für die CU charakteristische Barrierschaden wird durch den Pathogenese-assoziierten Zytokinsturm verursacht. Die erhöhte Translokation luminaler Antigene über das geschädigte Epithel trägt wiederum zur Aktivierung und Unterhaltung des GALTs bei und resultiert ebenfalls in einer Chronifizierung der intestinalen Entzündung. Deshalb lag der Fokus in den folgenden Zellkulturexperimenten auf der Epithelzellbarriere. Die Kultivierung von Caco-2-Zellen auf Trägermembranen in Transwell-Einsätzen simuliert *in vitro* eine biologische Barriere, ähnlich der Epithelzellbarriere im Gastrointestinaltrakt. Hierbei bilden Caco-2-Zellen durch die Kultivierung auf einer semipermeablen Membran einen dichten, differenzierten Zellverband mit einer mukosalen und einer serosalen Seite aus. Somit ermöglichte das Transwell-System einerseits den Zugang zu beiden Seiten des Monolayers und andererseits konnte die Integrität des Caco-2-Monolayers mittels TEER gemessen werden. Als barrieremodulierende Stimulanzen von basaler Seite wurden das pro-inflammatorischen Zytokin TNF α und THP-1-Makrophagen eingesetzt. Um den therapeutischen Effekt der

Tonmineralien auf die Epithelzellbarriere im Transwell-System zu untersuchen, wurden die Tonsuspensionen apikal appliziert.

In Abbildung 21 sind die Ergebnisse für unstimulierte Caco-2-Zellen dargestellt. Eine Koinkubation mit den drei Tonsuspensionen hatte keinen Integritätsverlust in den Caco-2-Zellen zur Folge. Es konnte eine signifikante Erhöhung ($p < 0,05$) des TEERs nach Koinkubation mit den Tonsuspensionen um 15,7 % ($< 15 \mu\text{m}$), 20,4 % ($< 5 \mu\text{m}$) und 19,7 % ($< 2 \mu\text{m}$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollen gemessen werden.

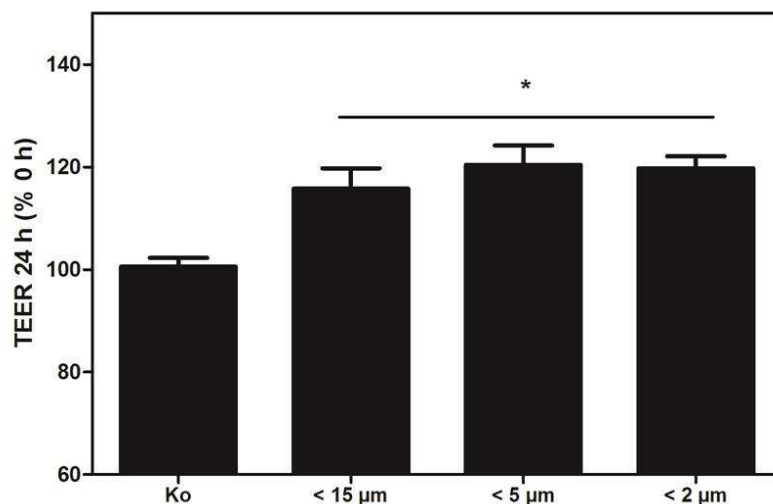


Abb. 21 Effekte von Tonsuspensionen auf den transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER) von unstimulierten Caco-2. Caco-2-Zellen wurden auf Transwell-Einsätzen für 21 Tage kultiviert und vor Versuchsbeginn der Ausgangs-TEER-Wert bestimmt. Anschließend erfolgte die Koinkubation mit den Tonsuspensionen ($< 15 \mu\text{m}$, $< 5 \mu\text{m}$ und $< 2 \mu\text{m}$). Die gemessenen TEER-Werte wurden durch die Subtraktion des Hintergrund-Widerstandes normalisiert und die relative prozentuale Veränderung des Widerstandes bezogen auf den Ausgangswert ($t = 0 \text{ h}$) abgebildet. Dargestellt sind die $\text{MW} \pm \text{SEM}$ ($n = 5-6$). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. * $p < 0,05$ vs. Ko.

In Abbildung 22A sind die Ergebnisse für $\text{TNF}\alpha$ -stimulierte Caco-2-Zellen dargestellt. Unbehandelte Kontrollzellen zeigten über 24 Stunden einen konstanten Widerstand ($100,5 \% \pm 1,7$), während die Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ zu einem signifikanten Abfall des Ausgangswiderstandes um 11,3 % führte ($p < 0,05$ vs. Ko). Die Koinkubation mit den drei Tonsuspensionen $< 15 \mu\text{m}$, $< 5 \mu\text{m}$ und $< 2 \mu\text{m}$ konnte den $\text{TNF}\alpha$ -induzierten TEER-Abfall statistisch signifikant verhindern ($p < 0,05$) und gleichzeitig den Widerstand nach 24 Stunden erhöhen um durchschnittlich 9,3 % ($< 15 \mu\text{m}$), 7,4 % ($< 5 \mu\text{m}$) und 6,8 % ($< 2 \mu\text{m}$). Die Koinkubation mit $< 15 \mu\text{m}$ war zudem signifikant erhöht gegenüber unbehandelten Kontrollzellen ($p < 0,05$).

In Abbildung 22B sind die Stimulationsversuche mit den Makrophagen dargestellt. Während der TEER von unbehandelten Kontrollzellen nur unwesentlich verändert war ($101,4 \% \pm 3,4$), führte die Stimulation mit den Makrophagen zur einer starken Suppression des gemessenen Widerstandes um $19,5 \%$ nach 24 Stunden ($p < 0,05$ vs. Ko). Auch in diesem Versuchsansatz konnte der Makrophagen-induzierte TEER-Abfall durch die Koinkubation mit den Tonmineralien statistisch signifikant verhindert werden ($p < 0,05$). Für $< 15 \mu\text{m}$, $< 5 \mu\text{m}$ und $< 2 \mu\text{m}$ betrug die durchschnittliche Erhöhung des Widerstandes $27,68 \%$ respektive $26,6 \%$ respektive $30,2 \%$. Dieser Anstieg war statistisch signifikant gegenüber unstimulierten Kontrollzellen ($p < 0,05$).

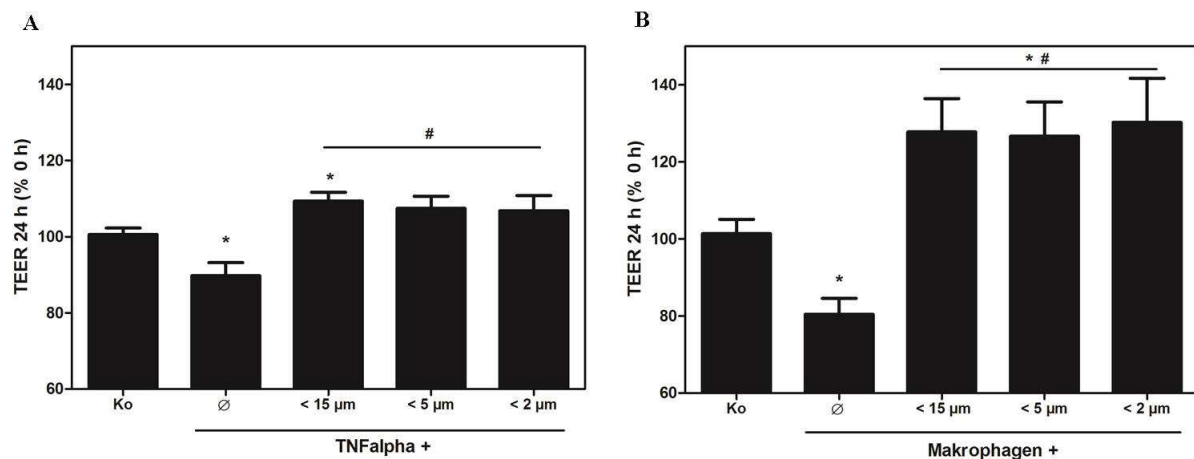


Abb. 22 Effekte von Tonsuspensionen auf den transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER) von Caco-2-Zellen nach Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ (A) und THP-1-Makrophagen (B). Caco-2-Zellen wurden auf Transwell-Einsätzen für 21 Tage kultiviert und vor Versuchsbeginn der Ausgangs-TEER-Wert bestimmt. Anschließend erfolgte die Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ (25 ng/ml) bzw. THP-1-Makrophagen für 24 Stunden. Parallel wurden Co-Inkubation mit den Tonsuspensionen ($< 15 \mu\text{m}$, $< 5 \mu\text{m}$ und $< 2 \mu\text{m}$) durchgeführt. Die gemessenen TEER-Werte wurden durch die Subtraktion des Hintergrund-Widerstandes normalisiert und die relative prozentuale Veränderung des Widerstandes bezogen auf den Ausgangswert ($t = 0 \text{ h}$) abgebildet. Dargestellt sind die $\text{MW} \pm \text{SEM}$ ($n = 5-7$). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. * $p < 0,05$ vs. Ko; # $p < 0,05$ vs. Ø $\text{TNF}\alpha$ /Ø Makrophagen.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die alleinige Koinkubation mit den Tonsuspensionen zu einer Erhöhung des gemessenen TEERs führte, was für einen widerstandsstärkenden Effekt der Tonmineralien spricht. Die Koinkubation der Caco-2-Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ oder THP-1-Makrophagen führte zu einem Integritätsverlust des Epithels, was sich in einer signifikanten Reduktion des TEERs zeigte. Die Tonsuspensionen waren in der Lage, die Stimulus-induzierte Reduktion des TEERs und die damit einhergehende erhöhte Permeabilität positiv zu beeinflussen.

4.3.4 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) zu NF- κ B in IEC-6

4.3.4.1 Die NF- κ B Aktivierung durch Lipid A

Die intestinale alkalische Phosphatase (iAP) ist in der Lage, eine Phosphatgruppe des Lipid A-Motivs im LPS-Molekül abzuspalten und kann darüber hinaus das Toxizitätspotential des Endotoxins wesentlich reduzieren.

Zum Nachweis dieses Dephosphorylierungs-Potentials wurde 1U iAP aus Kalb (ciAP) mit 1 μ g/ml Lipid A (*Salmonella enterica*, serotype minnesota Re 595) für drei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden IEC-6-Zellen mit unbehandeltem diphosphoryliertem Lipid A, ciAP-vorbehandeltem Lipid A oder dem monophosphorylierten Lipid A für 5; 20 oder 60 Minuten stimuliert. Als Positivkontrolle wurden IEC-6 Zellen mit 1 μ g/ml LPS *E.coli* (055:B5) für 20 Minuten stimuliert. Für die EMSA-Analyse wurde diese Positivkontrolle zusätzlich mit dem p65/NF- κ B-spezifischen Antikörper behandelt.

Abbildung 23 zeigt die Bindung von NF- κ B an das NF- κ B-spezifische Oligonukleotid unter dem Einfluss der oben genannten Stimulantien. Es kam zur einer zeitabhängigen NF κ B-Aktivierung nach Stimulation mit diphosphoryliertem und monophosphoryliertem Lipid A (Bahn 1–9) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Bahn 13). Die diphosphorylierte Form zeigte eine stärkere NF- κ B-Aktivierung als die monophosphorylierte Form. Die Vorbehandlung der diphosphorylierten Form mit ciAP führte zu einer deutlich niedrigeren NF κ B-Aktivierung im Vergleich zum unbehandelten Lipid A (Vergleich der Bahnen 5 und 6 bzw. 8 und 9). Als Negativkontrolle wurden IEC-6-Zellen für 60 Minuten mit 1U ciAP inkubiert. Es konnte kein Shift und somit keine NF- κ B-Aktivierung detektiert werden (Bahn 10).

Die Positivkontrolle (Bahn 12) zeigt, dass LPS einen starken Shift induzierte, der mittels Supershift (Bahn 11) als p65/NF- κ B identifiziert werden konnte. Somit konnte nachgewiesen werden, dass eine ciAP-Behandlung die NF- κ B-aktivierende Potenz des Lipid A deutlich reduziert.

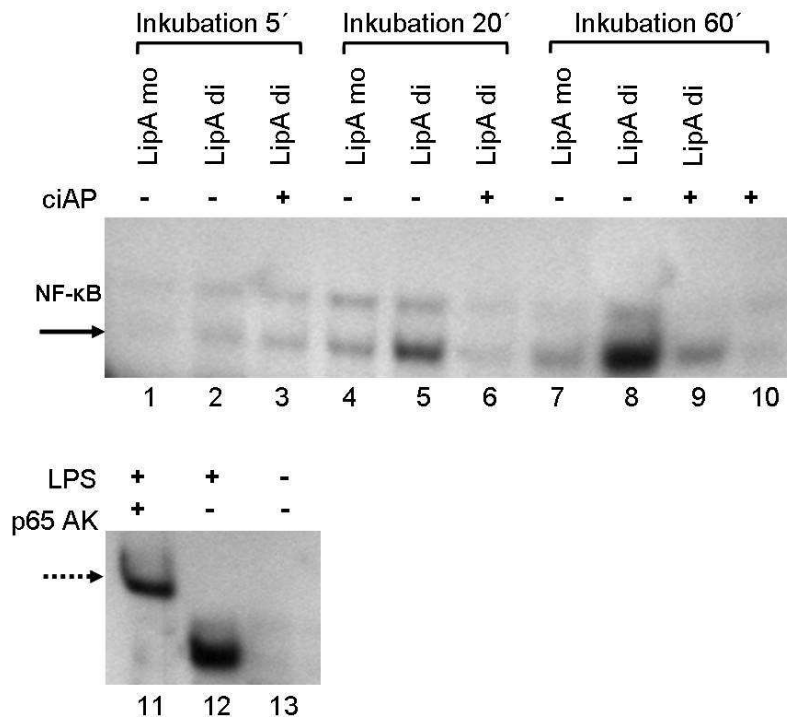


Abb. 23 NF-κB-Aktivierung nach Behandlung mit LPS, monophosphoryliertem Lipid A (LipA mo) oder diphosphoryliertem Lipid A (LipA di) sowie ciAP-vorbehandeltem Lipid A in IEC-6-Zellen. IEC-6-Zellen wurden mit den oben genannten Stimulantien für unterschiedliche Zeiten inkubiert. Die Kernextrakte wurden mittels ³²P-markierten NF-κB spezifischen Oligonukleotid-Sonden inkubiert und in einem 6%-igen Polyacrylamidgel elektro-phoretisch aufgetrennt. Die spezifische NFκB-Bande wurde mithilfe der Supershift-Analyse unter Zugabe des p65-Antikörpers (p65 AK) identifiziert (siehe gestrichelter Pfeil in Bande 11).

4.3.4.2 Die NF-κB-Aktivierung durch LPS

Nachfolgend wurde der Einfluss der ciAP auf Gesamt-LPS untersucht. Es wurde 1 µg/ml LPS (E.coli 055:B5) mit 1 U ciAP für drei Stunden inkubiert und vorbehandeltes bzw. unbehandeltes LPS zu IEC-6-Zellen für 5; 20 und 60 Minuten gegeben. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit TNFα (10 ng/ml) stimuliert. Nach Darstellung der Kernextrakte wurden diese mittels EMSA analysiert. Die NF-κB-Aktivierung ist repräsentativ in Abbildung 24A dargestellt.

Die LPS-Stimulation (Bahn 1–3) führte zu einer zeitabhängigen, starken NF-κB-Aktivierung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Bahn 10). Eine Vorbehandlung von LPS mit ciAP reduzierte die NF-κB Aktivierung deutlich (Bahn 4–6).

Die Positivkontrolle (Bahn 9) zeigt, dass TNFα im Vergleich zur LPS einen weniger starken Shift induzierte. Trotzdem konnte mittels Supershift-Analyse (Bahn 8) die spezifische p65/NF-κB identifiziert werden.

In Abbildung 24B ist die densitometrische Auswertung von sechs Stimulationsversuchen in IEC-6 Zellen dargestellt. Die Stimulation der Zellen mit LPS führte zu einer zeitabhängigen NF-κB-Aktivierung. Bereits nach fünf Minuten konnte ein deutlicher Shift detektiert werden. Nach 20 Minuten erreichte die NF-κB-Aktivierung das Maximum und es kam zu einer 28-fachen Erhöhung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Nach 60 Minuten sank die NF-

5 Diskussion

5.1 Die Etablierung des Kurzzeitschädigungsmodells

Die CU ist eine Form der chronisch rezidivierenden Entzündung des Gastrointestinaltraktes, deren Pathogenese bislang noch nicht hinreichend aufgeklärt ist. Derzeit werden eine komplexe Störung der epithelialen Barriere und eine aggressive zellvermittelte Immunantwort auf endogene und exogene Faktoren bei Patienten mit genetischer Prädisposition diskutiert [42]. Die CED stellt eine multifaktorielle Erkrankung dar und basiert auf komplexen Interaktionen zwischen verschiedenen Zellpopulationen.

Zur Aufklärung der pathologischen Mechanismen werden unter anderem verschiedene tierexperimentelle Modelle verwendet. Diese basieren auf chemischen, genetischen oder immunologischen Prinzipien und unterscheiden sich hinsichtlich Spezies und krankheitsauslösenden Agentien. Das bedeutet, dass keines dieser Modelle alle Eigenschaften einer CU vereint. Vielmehr bildet jedes Modell einzelne, für die humane Erkrankung charakteristische, CU-Merkmale ab, die somit einer Erforschung von Pathogenese und Entwicklung neuer Therapieoptionen zugänglich gemacht werden.

Für das Verständnis der frühen Pathogenese von CU-Erkrankungen stehen allerdings nur wenige tierexperimentelle Modelle zur Verfügung. Deshalb sollte in dieser Arbeit ein Kurzzeitschädigungsmodell etabliert werden, in dem eine mukosale Entzündung innerhalb kürzester Zeit induziert wird. Dieses Modell sollte dann einerseits die Analyse der frühen entzündlichen Prozesse in der Darmwand und andererseits die Testung potentiell neuer Therapeutika und deren Einfluss auf frühe mukosale Entzündungsprozesse ermöglichen.

Die Kolitis sollte über chemische Noxen induziert werden. Dazu wurden verschiedene chemische Noxen mittels *in situ*-Perfusion in den Darm von anästhesierten, laparotomierten Ratten appliziert. Die Dissektion wurde in einem definierten Jejunumsegment vorgenommen, wobei das vaskuläre System aufrechterhalten wurde. Anschließend wurde das Lumen des dissezierten Segments über einen definierten Zeitraum perfundiert. Dadurch ergab sich die Möglichkeit, nicht nur physiologische Mechanismen und pathophysiologische Eigenschaften des isolierten Organsystems genauer zu untersuchen, sondern auch proximal und distal vom perfundierten Segment Untersuchungen durchzuführen. Die Durchführung der *in situ*-Perfusion an den lebenden narkotisierten Versuchstieren bezog den Gesamtorganismus mit seinem systemischen Kreislauf und vegetativen Nervensystem sowie deren vielfältige Interaktion von Blut und dessen korpuskulären Bestandteilen mit dem mikrovaskulären Gefäßbett ein. Somit gewährleistet dieses Perfusionsmodell in hohem Grad physiologische Bedingungen. Gleichzeitig konnte aufgrund des experimentellen Designs die inflammatorischen Prozesse in der Darmwand und dem dahinterliegenden GALT ähnlich wie in den chemisch-induzierbaren Kolitis-Modellen analysiert werden.

Die chemisch-induzierbaren Kolitiden gehören aufgrund der guten Reproduzierbarkeit und der einfachen Handhabung zu den am häufigsten verwendeten Modellen.. Die chemischen Noxen vermitteln primär einen toxischen Effekt auf die intestinalen Epithelzellen und verursachen somit Defekte in der Epithelzellbarriere [225]. Der induzierte mukosale Barriereverlust ist durch eine gesteigerte Permeabilität gekennzeichnet und ermöglicht die Penetration von luminalen Antigenen und Mikroorganismen in die Mukosa, was schließlich zu einer erhöhten Stimulation des GALTs führt. Während TNBS einmalig appliziert wird, muss DSS über mehrere Tage verabreicht werden. Eine akute Kolitis ist in beiden Fällen ab Tag 3 nach Applikation etabliert [167, 226, 227]. Aufgrund der hohen Akzeptanz, der guten Reproduzierbarkeit und der einfachen Handhabung wurden diese chemischen Noxen für die Induktion der intestinalen Entzündung im Darmsegment verwendet. Wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben, führte DSS einerseits zu histologischen Veränderungen, verhinderte andererseits aber nachfolgende molekularbiologische Untersuchungen. TNBS dagegen hatte gar keinen Einfluss auf die Histologie. Somit waren DSS und TNBS nicht geeignet für die Etablierung des Kurzzeitschädigungsmodells und eine weitere chemische Noxe das Iodoacetamid kam zum Einsatz.

5.1.1 Die Perfusion mit IA induzierte Kolitis-ähnliche Veränderungen in der intestinalen Mukosa

Die Applikation von Sulfhydrylblockern zur Induktion einer CED-ähnlichen Entzündung wurde 1997 erstmalig von Rachmilewitz et al. und Satoh et al. beschrieben [173, 218]. Rachmilewitz et al. applizierten IA in das Jejunum von Ratten und verwendeten dabei unter anderem die Technik des „Closed loop“, wobei 100 µl IA (2 %) für 30 Minuten im Segment verweilten. Nach 24 Stunden waren im Jejunum mukosale Ulzerationen, Erosionen, Einblutungen und Zellinfiltrationen zu beobachten. Satoh et al. konnten ähnliche Effekte für den Sulfhydrylblocker N-ethylmaleimide (NEM) im Kolon zeigen. 3 % NEM intrarektal appliziert führten bereits nach einer Stunde zur Hyperämie, Ödemen und erhöhter Durchblutung in der Mukosa. Nach einer Ausdehnung der Inkubationszeit auf drei bzw. sechs Stunden manifestierte sich die Entzündung bis in die Submukosa und es waren Einblutungen, Nekrosen, das Ablösen der Mukusschicht sowie Infiltrationen von Neutrophilen zu beobachten.

In Anlehnung an den von Satoh et al. entwickelten histologischen Entzündungsscores wurden die IA-induzierten Veränderungen im Kurzzeitschädigungsmodell hinsichtlich ihres Schweregrades eingeteilt. Die 15-minütige IA-Perfusion mit nachfolgender zweistündiger Perfusion mit dem Kontrollmedium DMEM induzierte eine Kolitis-ähnliche Entzündung. Zu den charakteristischen Veränderungen nach IA-Schädigung zählten die Auflösung der regelmäßigen Krypten- und Zottenarchitektur, Ödeme, massive Einblutungen, vermehrt nekrotische Zellen auf der apikalen Seite sowie die Infiltration von Neutrophilen (Abb. 7). Die histopathologischen Veränderungen beschränkten sich aufgrund der kurzen Perfusionsdauer

nur auf die Mukosa und hier insbesondere auf die apikale Mukosa. Der histologische Gesamt-Score für die IA-Gruppe betrug durchschnittlich 6,58 Punkte (Abb. 9).

Unter Verwendung des Scores von Satoh et al. konnten weitere Arbeitsgruppen ähnliche histologische Veränderungen drei Stunden nach IA-Applikation ins Kolon nachweisen [192]. Die erhobenen histologischen Daten des Kurzzeitschädigungsmodells belegen somit im Einklang mit den publizierten Forschungsergebnissen, dass Sulfhydryl-Blocker fähig sind, innerhalb kürzester Zeit eine intestinale Entzündung zu induzieren. Im Kurzzeitschädigungsmodell konnte dies erstmalig für den Dünndarm bestätigt werden.

Wie im Kapitel 1.4.3 beschrieben, beruht die toxische Wirkung von IA auf intestinale Epithelzellen auf der Alkylierung von SH-Gruppen. Somit induziert IA ebenso wie DSS und TNBS einen primären Epithelzellschaden, der nachfolgend für den Verlust der epithelialen Integrität verantwortlich ist [219]. Die induzierte akute DSS- oder TNBS-Kolitis ist morphologisch und makroskopisch durch Hyperämie, Ulzerationen, schwere submukosale Ödeme und Läsionen sowie Zellinfiltrate charakterisiert [167, 168, 228, 229]. Diese Beobachtungen zeigen sich für DSS nach einer dreitägigen Gabe über das Trinkwasser, für TNBS sogar erst sieben Tage nach seiner Applikation. Karmeli et al. konnten für IA submukosale Entzündungen mit Nekrosen und Zellinfiltrationen bereits 24 Stunden nach deren Applikation nachweisen [230]. Des Weiteren zeigten Ratten im Langzeituntersuchungsraum von sieben Tagen typische Symptome einer Kolitis wie blutige Durchfälle und Gewichtsverlust, ähnlich wie sie auch für eine DSS- und TNBS-induzierte Kolitis charakteristisch sind [173]. Diese Ergebnisse beweisen, dass IA genauso wie DSS oder TNBS für die chemische Induktion einer experimentellen Kolitis verwendet werden kann. Dabei wurden jedoch nur für IA sehr frühe histopathologische Veränderungen im intestinalen Epithel beschrieben. Deshalb ist IA das am besten geeignete chemische Agens, um im Kurzzeitschädigungsmodell eine intestinale Entzündung in Anlehnung an die Kolitis auszulösen.

5.1.2 Die Perfusion mit IA induzierte eine erhöhte Infiltration von CD68⁺-Zellen

CD68⁺-Zellen, auch intestinale Makrophagen genannt, finden sich unmittelbar subepithelial in der Lamina propria und stellen eine wichtige antigenpräsentierende Zellpopulation des intestinalen Immunsystems dar. Als typische Vertreter der angeborenen Immunantwort und der „first line of defence“ bekämpfen sie Pathogene und deren Antigene durch Phagozytose oder über direkt vermittelter Zytotoxizität. Daneben sezernieren Makrophagen eine Reihe von immun- und entzündungsmodulierenden Mediatoren, welche wiederum direkt wirken oder in der Lage sind, weitere Immunpopulationen zu rekrutieren und die spezifische Immunantwort zu initiieren. Makrophagen übernehmen aufgrund ihrer ubiquitären Präsenz in der Mukosa demzufolge eine wichtige Funktion bei entzündlichen Prozessen des Darms. So konnte in Darm-Biopsien aus entzündeten Arealen von CED-Patienten eine erhöhte Anzahl CD68⁺-Zellen nachgewiesen werden [231, 232, 233].

Im Kurzzeitschädigungsmodell resultierte die IA-Perfusion in eine erhöhte Infiltration von CD68⁺-Zellen (Abb. 10). Auch im DSS- und TNBS-Kolitis-Modell wurden erhöhte Infiltrationen von CD68⁺-Zellen in das entzündete Gewebe beobachtet [234, 235, 236, 237]. Jedoch gibt es keine direkte Aussage zu dieser Zellpopulation in den beschriebenen IA-Kolitis-Modellen. Allerdings sind Literaturdaten über erhöhte Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS)-Werte 24 Stunden nach IA-Applikation ein indirektes Anzeichen für die vermehrte Infiltration von Makrophagen, da sie NOS exprimieren [238, 239, 240]. Trotz dieser Daten ist es im Kurzzeitschädigungsmodell unwahrscheinlich, dass nur zwei Stunden nach IA-Applikation die beobachtete Zunahme von CD68⁺-Zellen alleine durch Makrophagen verursacht wurde. Werden jedoch die eigenen sowie die publizierten histologischen Ergebnisse bezüglich der erhöhten Neutrophilen-Infiltration und die Beobachtungen von Amazada et al. berücksichtigt, können auch neutrophile Granulozyten positiv für CD68 sein [241]. Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass in entzündeten Biopsien von CED-Patienten eine erhöhte Anzahl CD68⁺-Zellen vorkam. Jedoch exprimierten diese Zellen neben den Makrophagen-Marker auch MPO, wobei es sich um einen klassischen Granulozyten-Marker handelt, der mit der Anzahl infiltrierender Zellen korreliert [242]. Somit ist CD68 kein spezifisches Antigen für Makrophagen, sondern kann als Marker für in entzündete Areale rekrutierte Neutrophile angesehen werden. Demzufolge handelt es sich im Kurzzeitschädigungsmodell um eine Mischpopulation aus CD68⁺-rekrutierten Neutrophilen sowie residenten und wenigen rekrutierten Makrophagen.

Ursächlich für die sehr frühe Infiltration von Neutrophilen im Kurzzeitschädigungsmodell ist laut Tolstanova et al. die erhöhte vaskuläre Permeabilität in der entzündeten Darmmukosa nach IA-Applikation [219]. Dabei gewährleistet eine intakte endotheliale Barriere einerseits die Versorgung der Zellen und schafft andererseits eine Begrenzung zwischen Mukosa und Gefäßsystem mit zirkulierenden Leukozyten. Eine erhöhte vaskuläre Permeabilität wird durch Wachstumsfaktoren wie Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) oder Platelet derived growth factor (PDGF) unterhalten, welche vermehrt bei Kolitis-Patienten sowie in der DSS-Kolitis exprimiert werden [243, 244, 245]. In der Arbeit von Tolstanova et al. konnten endotheliale Schäden im Kolon bereits 15 Minuten nach IA-Applikation nachgewiesen werden, während dieselben Effekte für DSS erst nach 24 Stunden beobachtet wurden. Des Weiteren waren VEGF und PDGF stark im Kolon exprimiert und es zeigten sich ähnliche histologische Veränderungen wie sie auch im Kurzzeitschädigungsmodell beobachtet wurden.

Zusammenfassend induziert IA sehr frühe endotheliale Schäden, welche zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität führen. Folglich kommt es innerhalb kürzester Zeit zur vermehrten Infiltration von zirkulierenden Neutrophilen aus dem Endothel in das entzündete Gewebe und erklärt den Anstieg von CD68⁺ Zellen im IA-Kurzzeitschädigungsmodell.

5.1.3 Die Perfusion mit IA induzierte eine erhöhte Expression von Zytokinen und führt zu einer verminderten Expression der intestinalen Alkalischen Phosphatase

Die erhöhte Expression von Zytokinen und Chemokinen durch residente und rekrutierte Zellen ist ein wesentlicher Prozess in der CU-Pathogenese [117, 246]. So bestätigten Untersuchungen an Kolon-Biopsien von CU-Patienten das Vorliegen eines regelrechten Zytokin-Sturms. Insbesondere während einer akuten CU oder in entzündeten Arealen wird eine Vielzahl von Zytokinen wie IL-6, IL-8, IL-10, IFN γ und TNF α sowie Chemokine wie MCP-1 oder NOS stark erhöht im Gewebe exprimiert [247, 248, 249].

Neben den histologischen Veränderungen und der erhöhten Anzahl von CD68⁺-Zellen wurden auch Veränderungen im Expressionsprofil von Targetgenen im Darmgewebe untersucht. In dieser Arbeit konnte erstmalig bereits zwei Stunden nach IA-Applikation ein signifikanter Anstieg der IL-6-, IL-10- und MCP-1-mRNA nachgewiesen werden (Abb. 11). Somit konnte durch die IA-Perfusion im Kurzzeitschädigungsmodell die Expression von Zytokinen induziert werden, wie sie auch in der CU-Pathogenese eine Rolle spielen.

Im Modell der IA-induzierten Kolitis untersuchten lediglich Barada et al die Proteinexpression von Zytokinen [250, 251]. Sechs Stunden nach IA-Applikation konnten sie einen Anstieg von IL-6 und IL-10 nachweisen. Da es sich hierbei um eine Proteinexpression handelte, erklärt dies die sehr frühen Veränderungen der mRNA-Expression im Kurzzeitschädigungsmodell. Auch die Applikation von TNBS führte bei Barada et al. nach drei Stunden zur erhöhten IL-6 und IL-10 Expression im Kolon. Für die DSS-Kolitis gibt es keine Berichte über so frühe Anstiege der untersuchten Zytokine. Jedoch konnten im Kolon von Tieren, welche sieben Tage DSS-haltiges Trinkwasser zu sich genommen haben, erhöhte IL-6, IL-10 und MCP-1 Werte nachgewiesen [252, 253, 254, 255].

Klassischerweise werden die untersuchten Entzündungsmediatoren vorrangig von rekrutierten Makrophagen, Neutrophilen und Lymphozyten generiert. Die Analyse des perfundierten Darmsegments hinsichtlich verschiedener Zellpopulationen zeigte jedoch nur einen Anstieg bei CD68⁺-Zellen, wohingegen es zu keiner Veränderung bei CD4⁺- und CD8⁺-Zellen kam. Die Infiltration von Makrophagen und Neutrophilen in das entzündete perfundierte Gewebe erklärt einerseits den Anstieg der IL-6-, IL-10- und MCP-1-Expression. Andererseits können neben rekrutierten Zellen auch residente Zellen zur Änderung des Expressionsprofils beitragen. So exprimieren im Epithel lokalisierte intraepitheliale Lymphozyten innerhalb kürzester Zeit IL-6 nach einer fokal induzierten mukosalen Verletzung [256]. Ebenso sind residente Makrophagen eine Quelle für MCP-1 [257]. Neben diesen Immunzellen konnten ähnliche Beobachtungen auch bei intestinalen Epithel- und Endothelzellen gemacht werden. So exprimierten Epithelzellen von CU-Patienten im aktiven Schub vermehrt IL-6 und IL-10 [258, 259, 260]. Ebenso konnte die Expression von MCP-1 durch Epithel- und Endothelzellen in CED-Patienten nachgewiesen werden [261, 262]. Dabei

reagieren Epithelzellen auf pro-inflammatorische Stimuli, wie sie in der CU-Pathogenese vorliegen, mit einer erhöhten IL-6- und MCP-1-Expression, was *in vitro* gezeigt wurde [221, 263]. Die Expression von IL-6, IL-10 und MCP-1 ist dabei nicht spezifisch für humane Zellen, sondern konnte auch für Ratten- und Schweine-Epithelzellen nachgewiesen werden [264, 265, 266].

Insgesamt sprechen diese Untersuchungen dafür, dass die gemessene Expressionsänderung im Darmsegment nur auf residente und infiltrierende Makrophagen, Neutrophile und Epithelzellen zurückzuführen ist, denn die Kürze der Perfusion schließt eine erhöhte Migration von Lymphozyten in das entzündete Gewebe aus.

Der Einfluss von IA auf die Expression der iAP, ein wichtiger defence-Faktor der mukosalen Abwehr, wurde in dieser Arbeit erstmalig beschrieben. Es zeigte sich im Kurzzeitschädigungsmodell ein signifikanter Abfall der iAP-mRNA-Expression (Abb. 11).

Die Korrelation der iAP-Expression mit dem Entzündungsstatus im Darm konnte von mehreren Arbeitsgruppen bewiesen werden [122, 123]. Die Daten zeigten in Übereinstimmung mit dem Kurzzeitschädigungsmodell eine verminderte iAP-Expression in Biopsien aus entzündeten Bereichen verglichen mit gesundem Kontrollgewebe. Verantwortlich für diesen Effekt ist neben dem entzündungsassoziierten Epithelzellverlust auch das umgebende pro-inflammatorische Milieu. Malo MS et al. konnten einen inhibierenden Einfluss auf die iAP-Expression für die Zytokine IL1 β und TNF α nachweisen [267]. Auch wenn diese Zytokine im Kurzzeitschädigungsmodell nicht untersucht wurden, so ist denkbar, dass ihre Expression ebenfalls durch die IA-Perfusion beeinflusst wird.

Vor dem Hintergrund ihrer Fähigkeit zur Dephosphorylierung des Lipid A-Motivs im LPS trägt die Reduktion der iAP zu einer vermehrten NF- κ B-Aktivierung durch im Lumen vorliegendes LPS bei. Dies konnte in eigenen *in vitro*-Studien auch in LPS- und diphosphorylierten Lipid A-stimulierten IEC-6-Zellen nachgewiesen werden (siehe Kap. 4.3.4). Hingegen hatte die Stimulation mit monophosphorylierten Lipid A oder mit diphosphorylierten Lipid A beziehungsweise LPS, welche zuvor mit iAP inkubiert wurden, eine verminderte NF- κ B-Aktivierung in den Zellen zur Folge (Abb. 23 und 24). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Studien von Poelstra et al. und belegen, welche wichtige Rolle die iAP bei der mukosalen Abwehr übernimmt [126, 268]. Nur eine physiologische Enzymaktivität ist in der Lage, luminales LPS zu dephosphorylisieren und die Induktion weiterer Signalwege über TLR4 und NF- κ B zu unterbinden.

5.1.4 Die Vorteile des Kurzzeitschädigungsmodells

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal der Einfluss einer Perfusion mit IA auf die intestinale Mukosa untersucht. Im Gegensatz zu anderen Arbeitsgruppen, welche Analysen des Darmgewebes nach Induktion einer Entzündung erst zu späteren Zeitpunkten durchführten, konnten Veränderungen im Kurzzeitschädigungsmodell bereits zwei Stunden nach IA-Perfusion nachgewiesen werden. Dass sich diese IA-induzierte Entzündung dabei nur auf den perfundierten Teil beschränkte, zeigten die Untersuchungen des Darmgewebes proximal und distal. Hier konnten weder histologische Veränderungen im Gewebe noch eine erhöhte Expression der pro-inflammatorischen Marker IL-6 und MCP-1 nachgewiesen werden (Abb. 12). Somit kann ein Einfluss von IA auf das umliegende Gewebe im Kurzzeitschädigungsmodell im vorgenommenen Untersuchungszeitraum ausgeschlossen werden. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Studien von Barada et al. [250, 251]. In diesen Arbeiten wurden histologische Veränderungen nach IA- und TNBS-Applikation nur im betroffenen Darmabschnitt beobachtet, proximal vom Kolon zeigte sich eine unauffällige Darmschleimhaut. Dagegen stehen die Ergebnisse derselben Arbeitsgruppe hinsichtlich der Zytokin-Expression in nicht-betroffenen Darmabschnitten. So resultierte die IA-Applikation in das Kolon nach sechs Stunden ebenfalls in einer erhöhten proximalen IL-6- und IL-10-Expression mit absteigender Intensität zum Duodenum. Für TNBS konnte drei Stunden nach Applikation ins Kolon ein Anstieg der IL-6-Expression nur im Duodenum nachgewiesen werden. Auch wenn die Messwerte für IL-6 und IL-10 in nicht-betroffenen Darmabschnitten deutlich unter den Werten des entzündeten Kolons lagen und histologische Beweise für eine Entzündung fehlten, kann ein Einfluss von IA und TNBS auf den gesamten Darm nicht ausgeschlossen werden. Ob die Ausdehnung der Perfusionsdauer im Kurzzeitschädigungsmodell ähnliche Effekte proximal und distal verursacht, bleibt dabei zu untersuchen.

Zusammenfassend konnte durch die Perfusion mit IA eine Entzündung im Darm induziert werden, welche in Hinblick auf die Histologie, der infiltrierenden Zellpopulationen und des Expressionsprofils Gemeinsamkeiten mit DSS- und TNBS-Kolitis-Modellen aufweist sowie Aspekte der humanen CU abbildet. Dabei liegt der Fokus aufgrund des experimentellen Designs auf der akuten, frühzeitigen intestinalen Entzündung. Somit ermöglicht das etablierte Kurzzeitschädigungsmodell die Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen einerseits und die Testung potentiell neuer Therapeutika und deren Einfluss auf die intestinale Entzündung andererseits.

5.2 Die Wirkung von Therapeutika auf die IA-induzierte Kolitis

Nach erfolgreicher Etablierung des Kurzzeitschädigungsmodells wurde der Einfluss verschiedener Therapeutika auf die induzierte intestinale Entzündung untersucht. Dabei kamen einerseits das Kortikosteroid Dexamethason als Vertreter der konventionellen Therapiebehandlung und andererseits das Probiotikum Mutaflor als Vertreter der alternativen

Therapiestrategie zum Einsatz. In Hinblick auf die anfangs formulierte Zielstellung zur Testung potentiell neuer Therapeutika im Kurzzeitschädigungsmodell wurde das als CU-Therapieoption gänzlich unbekannte Tonmineral Resormin eingesetzt. Die positive Wirkung und gute Verträglichkeit von Tonmineralien bei der Behandlung von Durchfallerkrankungen wurde in vielen humanen Studien belegt. Zudem zeigten weitere *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen ein anti-inflammatorisches Potential für die Tonmineralien. Resormin vereint dabei aufgrund seines Wechsellagerungsminerals viele Eigenschaften, die bei der Behandlung von intestinalen Entzündungen einen therapeutischen Effekt vermitteln könnten.

Dexamethason wird aufgrund des Risikos der Steroidabhängigkeit nur zur Therapie des akuten Schubs eingesetzt und kann demzufolge als Positiv-Therapie-Kontrolle für die IA-induzierte Entzündung verwendet werden. Mutaflor ist laut DGVS als einziges Probiotikum als Alternative zur Standardmedikation bei der Remissionserhaltung zugelassen. Resormin wurde bisher nur bei der Behandlung von Durchfallerkrankungen verwendet.

5.2.1 Dexamethason

Die Behandlung einer akuten Kolitis verfolgt als primäres Ziel die Remissionsinduktion. Dabei stellen die Kortikosteroide eine wichtige Substanzklasse in der konventionellen CU-Therapie dar. Trotz der für Steroide typischen Nebenwirkungen wie Osteoporose, Diabetes oder Infektanfälligkeit und des Risikos für die Entwicklung einer Steroidresistenz, erfolgt die Schubtherapie der schweren Colitis unabhängig vom Lokisationsort bevorzugt mit Steroiden [269]. Auch in einer Vielzahl von tierexperimentellen Kolitis-Modellen wurde Dexamethason von mehreren Arbeitsgruppen als Positiv-Therapie-Kontrolle verwendet [270, 271, 272, 273].

Die Perfusion mit Dexamethason im Kurzzeitschädigungsmodell resultierte in einem signifikant verminderten histologischen Score (Abb. 13). Die Analyse der mRNA-Expression im perfundierten Darmsegment zeigte eine verminderte Expression für die untersuchten Zytokine und eine erhöhte Expression für die iAP (Abb. 16). Für MCP-1 und iAP waren die Änderungen, verglichen mit den nicht-therapierten Tieren, signifikant.

Die Ergebnisse im Kurzzeitschädigungsmodell stehen im Einklang mit den oben genannten publizierten *in vivo*-Daten. Auch hier konnte durch die Dexamethason-Therapie der Verlauf der DSS- und TNBS-induzierten Kolitis positiv beeinflusst werden. Neben dem verbesserten histologischen Score konnte auch eine Reduktion der MPO-Aktivität im Gewebe nachgewiesen werden. Auch wenn die MPO-Aktivität im Kurzzeitschädigungsmodell nicht direkt gemessen wurde, kann die verminderte Anzahl von Neutrophilen und Makrophagen im perfundiertem Segment als indirektes Maß für die MPO-Aktivität verwendet werden.

Die Reduktion der IL-6-, IL-10- und MCP-1-Expression nach Perfusion mit Dexamethason repräsentiert die anti-inflammatorische Wirkung von Dexamethason, wie sie auch in tierexperimentellen Kolitis-Modellen nachgewiesen wurde. Dabei wurde das vorherrschende

Zytokinmilieu durch die infiltrierenden Immunzellen bestimmt, welche im Fall CD68⁺ Zellen nach Dexamethason-Therapie leicht vermindert vorlagen (Abb. 15). Jedoch sind zur Beginn der mukosalen Entzündung die residenten Zellen maßgeblich für das vorherrschende Zytokinmilieu verantwortlich. Dass Dexamethason seine anti-inflammatorische Wirkung auch auf diese Zellpopulationen vermittelt, zeigten Szikszai et al. in einer kürzlich veröffentlichten Studie [274]. In gesunden humanen Biopsien führte die Koinkubation mit Dexamethason zur einer verminderten Expression von kostimulierenden Signalen auf APCs sowie zur einer geringen IL-6- und IL-8-Sekretion. Diese Effekte waren auch im Kurzzeitschädigungsmodell zu beobachten und resultierten nachfolgend in einer Supprimierung der Immunantwort. Die Ergebnisse der oben genannten Studie beschränkten sich allerdings nur auf die Zellen innerhalb der Mukosa, da die Biopsien zuvor von ihren Epithelzellen befreit wurden. Wie in Kapitel 5.1.3 beschrieben, ist diese Zellpopulation jedoch ebenfalls in der Lage aktiv das Zytokinmilieu im Darm zu beeinflussen. Jedoch konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass Dexamethason sein supprimierendes und anti-inflammatorisches Potential ebenfalls auf Epithelzellen vermittelte, was sich in einer verminderten MHC-II- sowie MCP-1-Expression widerspiegelte [221, 275].

Von Glukokortikoiden ist bekannt, dass sie schnell und fast vollständig resorbiert werden. Dexamethason diffundiert aufgrund seiner Lipophilie sehr schnell durch die Zellmembranen und bindet an den im Zytoplasma vorliegenden Glukokortikoid-Rezeptor. Dieser aktive Komplex transloziert in den Zellkern und interagiert mit Promotor-Regionen der für ihn spezifischen Gene. In Folge kommt es zur Hemmung der Proteinbiosynthese von pro-inflammatorischen Zytokinen [276]. Die Ergebnisse des Kurzzeitschädigungsmodells untermauern diese postulierten Daten hinsichtlich einer potenten und raschen Wirksamkeit von Kortikosteroiden bei der Behandlung einer akuten CU [277, 278].

Zusammenfassend vermittelte Dexamethason auch im Kurzzeitschädigungsmodell seine immunsupprimierende und anti-inflammatorische Wirkung und kann demzufolge als Positiv-Kontrolle in vergleichenden Therapie-Untersuchungen verwendet werden.

5.2.2 Mutaflor (EcN)

In der Literatur existiert eine Vielzahl von randomisierten klinischen Studien zur praktischen Anwendung von EcN und dessen positiver Wirkung in der Therapie und Remissionserhaltung der CU. Die Auswertung von endoskopischen Befunden zeigte, dass EcN bei der Verbesserung des Krankheits-Aktivitäts-Indexes, dem Erreichen einer Remission sowie der Prävention von Rückfällen genauso effizient war, wie die Standardmedikation Mesalazin [58, 57, 60]. Auch im DSS-Kolitis-Modell führte der Einsatz von EcN zu einem verbesserten Krankheitsbild. Die Tiere verloren unter EcN-Therapie weniger Gewicht, der histologische Score der Därme war signifikant vermindert und das Kolon weniger stark verkürzt [28, 162]. Die therapeutischen Effekte des Probiotikums waren einerseits auf die Stärkung der epithelialen Barriere zurückzuführen, welche sich in einer

vermehrten AJ-Expression und einer verringerten Permeabilität gegenüber Makromolekülen äußerte. Des Weiteren wurde in EcN-therapierten Tieren eine verminderte Expression pro-inflammatorischer Zytokine durch T-Lymphozyten aus MLN nachgewiesen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass EcN auch im Kurzzeitschädigungsmodell barrierestärkende und immunmodulierende Effekte vermitteln konnte und diese dem Therapieerfolg von EcN zugrunde lagen.

Im Kurzzeitschädigungsmodell resultierte die Perfusion mit Mutaflor in einem signifikant erniedrigten histologischen Score, einer signifikant verminderten Expression von IL-6 und MCP, einer geringeren IL-10-Expression sowie in einer leicht erhöhten Expression von iAP (Abb. 14 und 16).

In Hinblick auf die positiven Effekte von EcN auf die Histologie des Darmsegmentes und die Zytokinexpression, bestätigten sich die oben genannten Beobachtungen aus den humanen und tierexperimentellen Studien auch im Kurzzeitschädigungsmodell.

Eine mögliche Erklärung für diesen Therapieerfolg könnte in der experimentell-bedingten entzündungsnahen Applikation von EcN liegen. Unterstützt wird diese Annahme durch die Arbeiten von Grabig et al. [162] Deren Arbeit verglich die orale und rektale Gabe von EcN im DSS-Kolitis-Modell und zeigte für die rektale Applikation eine Überlegenheit bezüglich der Histologie, dem Gewichtsverlauf und der Zytokinexpression. Auch eine humane Studie konnte für die rektale Gabe einen dosisabhängigen Effekt auf DAI, Histologie und Zeit bis zum Erreichen von Remission nachweisen [279]. Allerdings erfolgte in dieser Studie nur der Vergleich mit Placebo-therapierten Patienten. Wünschenswert wäre die parallele Untersuchung von oraler vs. rektaler Applikation. Auch in der konventionellen Therapie werden Patienten mit distaler Kolitis und einem aktiven Schub von leichter bis mittlerer Aktivität bevorzugt topisch mit Zäpfchen, Schäumen und Klysmen behandelt [39]. Somit werden die benötigten Wirkstoffkonzentrationen am Ort der Entzündung erreicht und die systemische Belastung ist geringer, als bei oraler Einnahme [280]. Zusammenfassend scheint mit Blick auf die Manifestation der CU und der DSS-Kolitis hauptsächlich im distalen Kolon, die direkte Applikation von Wirkstoffen für einen gesteigerten Therapieeffekt verantwortlich zu sein. Die positive Wirkung von EcN auf die IA-induzierte Schädigung im Kurzzeitschädigungsmodell belegt diese These. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die oben genannten Ergebnisse in tierexperimentellen Langzeit-Kolitis-Modellen generiert wurden. Da die Analyse des Gewebes erst mehrere Tage nach Induktion der Entzündung erfolgte, können sich die dem Therapieerfolg zugrunde liegenden Mechanismen von denen im Kurzzeitschädigungsmodell unterscheiden. Jedoch konnten die protektiven Effekte von EcN auf die intestinale Barriere sowie die Modulation des Zytokinprofils auch *in vitro* an humanen Epithel- und Immunzellen nachgewiesen werden [156, 281, 282, 283, 284]. Zusätzlich war EcN in der Lage die Adhärenz und Invasion pathogener Bakterien in humane und porcine Epithelzellen zu verhindern [158, 285, 286]. Diese Ergebnisse sind unter dem

Aspekt interessant, da bei CED-Patienten eine Verschiebung der bakteriellen Flora zugunsten pathogener Keime beobachtet wurde [287, 288]. Die zahlreichen Befunde aus humanen Studien, CED-Tiermodellen und *in vitro*-Versuchen führten deshalb zur der Hypothese, dass EcN zum einen direkte Effekte auf intestinale Epithelzellen und darunterliegende Immunzellen vermittelt, zum zweiten beeinflusst es die intestinale Flora und zum dritten hat es die Fähigkeit zur lokalen und systemischen Immunmodulation [28, 289, 290, 291]. In Betracht des gewählten experimentellen Designs können jedoch nicht alle beschriebenen Wirkmechanismen dem Therapieerfolg im Kurzzeitschädigungsmodell zugrunde liegen. Denn die zeitliche Limitierung der EcN-Wirkung auf zwei Stunden Perfusion schließt eine weitreichende Modifikation der intestinalen Flora aus. Vielmehr musste der direkte Einfluss auf das Epithel und die residenten Immunzellen in der Lamina propria für die beobachteten therapeutischen Effekte verantwortlich gewesen sein. In diesem Kontext ist die Modifikation des intestinalen Zytokin-Profiles durch die Suppression von pro-inflammatorischen Zytokinen eine weitere Erklärung für den Therapieeffekt von EcN im Kurzzeitschädigungsmodell (Abb. 16A). In Folge kam es zu einer verminderten Aktivierung von Immunzellen, was sich in der Histologie durch eine verminderte Neutrophilen-Infiltration sowie weniger CD68⁺-Zellen im Gewebe widerspiegelte (Abb. 15). Inwiefern EcN direkt Einfluss auf die intestinale Barriere nimmt oder die Veränderung des Zytokinprofils indirekte Auswirkungen auf die epitheliale und endotheliale Permeabilität hat, bleibt im Kurzzeitschädigungsmodell zu untersuchen.

Wie eingangs erwähnt, sind für Probiotika eine Vielzahl von therapeutischen Wirkmechanismen beschrieben. Jedoch können diese aufgrund der Vielfalt an probiotischen Organismen nicht als eine homogene Gruppe von Mikroorganismen angesehen werden. Vielmehr müssen Wirkmechanismen immer spezies- und stammspezifisch betrachtet werden. Für EcN können die beschriebenen Effekte im Kurzzeitschädigungsmodell als spezifisch für seinen Stamm postuliert werden, wenn dieser mit pathogenen Vertretern seiner Spezies verglichen wird. Für diese sogenannten E.coli-Pathovaren wurden keine therapeutischen Wirkmechanismen beschrieben. Vielmehr verursachen diese aufgrund ihrer Virulenzmerkmale intestinale und extraintestinale Infektionen wie Harnwegserkrankungen, Septikämien, Meningitiden und Durchfallerkrankungen [292]. Auch der Vergleich mit apathogenen Stämmen spricht für ein alleiniges Therapie-Potential von EcN. So konnte für E.coli K12 weder die Fähigkeit der Adhärenz an Epithelzellen noch ein anti-inflammatorisches Potential *in vitro* nachgewiesen werden [284, 293]. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass andere apathogene E.coli-Stämme vergleichbare Effekte vermitteln. Da E.coli bis heute allerdings der einzige Vertreter seines Stammes ist, der alle Kriterien eines Probiotikums erfüllt, besteht aus therapeutischer Sicht keine Notwendigkeit, apathogene Stämme ohne probiotische Eigenschaften zu evaluieren.

Werden die therapeutischen Effekte von EcN jedoch mit Studien über andere Probiotika verglichen, zeigt sich eine Vielzahl von Gemeinsamkeiten. So wurden für verschiedene

Lactobazillus-Stämme und dem Mischpräparat VSL# 3 ebenfalls immunmodulatorische und anti-inflammatorische Effekte *in vitro* und *in vivo* beschrieben [39, 175, 294, 295, 296]. Jedoch unterscheiden sich Probiotika hinsichtlich ihrer zugrundeliegenden Wirkmechanismen. Dafür sprechen Untersuchungen des induzierten Zytokinprofils im Darm sowie der Fähigkeit, Immunzellen zu aktivieren [291, 297]. Diese und andere Studien belegen, dass nachgewiesene immunmodulatorische und anti-inflammatorische Wirkungen eines Probiotikums immer stammspezifisch sind und nicht ungeprüft auf andere Probiotika übertragen werden dürfen [298, 299, 300].

Ob die Wirkung von EcN im Kurzzeitschädigungsmodell spezifisch für Probiotika im Allgemeinen ist, sollte deshalb untersucht werden.

5.2.3 Resormin

Neben Studien zur guten Wirksamkeit von Silikaten bei der Behandlung von Durchfallerkrankungen gibt es nur wenige Arbeiten, die die Wirkung von Silikaten in Kolitis-Modellen näher untersucht haben. Vier Arbeitsgruppen untersuchten das therapeutische Potential von oral applizierten Smektiten im TNBS-Kolitis-Modell. Drei von ihnen konnten einen positiven Einfluss auf die Schwere der induzierten Kolitis und den histologischen Score nachweisen [203, 301, 302]. Im Kolon zeigten sich weniger mukosale Ulzerationen, Ödeme und Infiltrationen mit Neutrophilen. Im Modell der durch Essigsäure induzierten Entzündung konnte eine vergleichbare Wirkung beobachtet werden [303]. Ein weiterer Parameter für den therapeutischen Effekt Smektit-behandelter Tiere war die verminderte Expression pro-inflammatorischer Mediatoren im Kolon und Serum. Basierend auf diese Beobachtungen, welche, bis auf die erhöhte Expression des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6, im Einklang mit den erhobenen Ergebnissen dieser Arbeit stehen, war es sehr wahrscheinlich, dass dem Therapieerfolg von Resormin im Kurzzeitschädigungsmodell ähnliche Wirkmechanismen zugrunde lagen.

Im Kurzzeitschädigungsmodell konnte erstmalig die Wirkung eines Smektit-haltigen Tonminerals auf eine IA-induzierte Entzündung nachgewiesen werden. Analog zu Dexamethason und Mutaflor konnte durch die Perfusion mit Resormin der histologische Score signifikant vermindert werden (Abb. 14). Im Vergleich zu den beiden anderen Therapiegruppen waren die histopathologischen Veränderungen aufgrund der IA-induzierten Entzündung in der Resormin-Gruppe am geringsten ausgeprägt. Der Effekt auf die untersuchten Targetgene war allerdings etwas komplexer (Abb. 16). Es wurde eine vermehrte IL-6- und IL-10-Expression nachgewiesen, während MCP-1 stark signifikant vermindert exprimiert wurde. Für iAP zeigte sich eine leicht erhöhte Expression.

Auffälliges Ergebnis nach Resormin Therapie war die am stärksten erhöhte IL-6-mRNA-Expression. IL-6 zählt zu den pro-inflammatorischen Zytokinen und seine starke Expression widerspricht einer therapeutischen Wirkung von Resormin. Jedoch muss die Anwesenheit von IL-6 im entzündeten Gewebe differenziert betrachtet werden. Laut einer aktuellen Arbeit

von Kuhn et al. war eine erhöhte IL-6 Expression in der akuten Entzündungsphase mit einer vermehrten Wundheilung assoziiert und in IL-6 knock out Mäusen zeigten sich kaum proliferierende Epithelzellen [256]. Demzufolge kann IL-6 zellwachstumsstimulierend wirken, was für eine effektive Wundheilung essentiell ist. Neben infiltrierenden Neutrophilen sind Epithelzellen, residente IELs und Immunzellen verantwortlich für eine erhöhte IL-6-Expression. Jedoch lagen Neutrophile und Makrophagen nur gering im perfundierten Gewebe vor. Der Wundheilungsprozess im entzündeten Gewebe verläuft unabhängig von infiltrierenden Neutrophilen, wie Seno et al. durch Blockierung dieser Zellpopulation mittels monoklonaler Antikörper zeigen konnten [304]. Somit ist eine erhöhte IL-6 Expression nicht zwangsläufig an die Infiltration von Neutrophilen gekoppelt, sondern kann allein durch residente Zellen verursacht werden. Ob die hohe IL-6 Expression in der Resormin Gruppe im Kurzzeitschädigungsmodell für eine gesteigerte Wundheilung und Proliferation steht, könnte durch eine Doppelmarkierung von Epithelzellen mit IL-6 und einen Proliferationsmarker wie zum Beispiel KI-67 nachgewiesen werden.

Der therapeutische Effekt von Resormin könnte in seiner Fähigkeit liegen, eine Art Schutzfilm über der Wunde zu bilden. Dies wurde in den Arbeiten von Ward et al. und Gerlach et al. postuliert [305, 306]. Hier wurden Smektite in ihrer Anwendung als Wundpflaster untersucht. Hintergrund ist die Therapie von - in der Regel tödlich verlaufenden - unkontrollierten, arteriellen Blutungen, wie sie bei Kampfhandlungen und auch bei Trauma-Patienten auftreten [307, 308, 309]. Der Einsatz von Smektiten als Pulver oder in Verbindung mit Verbänden führte zur exzellenten Koagulation der induzierten arteriellen Blutungen. Auch wenn diese Art von Verletzungen nicht relevant für CU erscheint, so sind die zugrundeliegenden Prozesse nach einer Gefäßverletzung dieselben. Infolge einer zerstörten Endothelschicht führt der Kontakt zwischen subendothelialer Matrix und Thrombozyten zu deren sofortiger Aktivierung [310]. Dabei werden zahlreiche pro-inflammatorische und vasokonstriktive Mediatoren aus ihren Granulas freigesetzt und Adhäsionsmoleküle auf ihrer Oberfläche exprimiert, welche wiederum weitere Thrombozyten, Granulozyten und Monozyten rekrutieren [311]. Solche Verletzungen, wenn auch im kleineren Maßstab, wurden ebenfalls im Kurzzeitschädigungsmodell als Folge der induzierten Entzündung und den damit verbundenen Integritätsverlust des Endothels beobachtet. In der Histologie zeigten sich massive Einblutungen in das Gewebe und der Hemorrhage-Score war um durchschnittlich 1,3 Punkte erhöht (Abb. 9A). Die Reparatur dieser Endothel-Verletzungen erfolgt durch Thrombozyten, welche lokal einen mechanischen Verschluss bilden und so die Hämostase vorantreiben [312, 313]. Dieser Thrombus führt zum Wundverschluss und verhindert somit das Eindringen möglicher Pathogene, welche ihrerseits wieder residente Zellen stimulieren könnten. Dieser Mechanismus ist ebenfalls für das Resormin vorstellbar, da histologisch nur minimale Einblutungen in das Gewebe beobachtet wurden und der Hemorrhage-Score durchschnittlich nur 0,2 Punkte betrug (Abb. 14A). Somit wurden zum Lumen gerichtete Gefäßverletzungen, welche mit einer Blutung einhergehen, durch die

Perfusion mit Resormin versiegelt. Diese provisorische Matrix hatte dann zur Folge, dass die Rekrutierung und Aktivierung weiterer Thrombozyten sowie die Stimulation residenter Zellen durch luminale Antigene unterbunden war.

Ein weiterer möglicher Wirkmechanismus von Smektiten, der seinen therapeutischen Erfolg erklären könnte, ist der Einfluss auf die epitheliale Barriere. Gardiner et al. verglichen drei verschiedene Tonminerale im TNBS-Kolitis-Modell und konnten im Plasma von Smektit-therapierten Tieren eine Reduktion der Endotoxin-Konzentration nachweisen [202]. Ursächlich für eine erhöhte Endotoxin-Konzentration im Blut von CED-Patienten ist die Pathogenese-assoziierte erhöhte Permeabilität, welche den Übertritt luminaler Antigene über das Epithel in die Zirkulation ermöglicht [314]. Chen et al. und Gonzalez et al. konnten nachweisen, dass unter Smektit-Therapie die TNBS-induzierte Reduktion von Mucin-2 verhindert wurde [301, 203]. Typischerweise kommt es aufgrund der induzierten Entzündung zu massiven Gewebeschäden, die unter anderem auch mit dem Verlust von Mucin-produzierenden Becherzellen einhergehen, wie es auch in der IA-Gruppe zu beobachten war. In Resormin-therapierten Tieren war der gesamthistologische-Score mit durchschnittlich 1,6 am niedrigsten (Abb. 14) und im Gewebe war eine Vielzahl von intakten Becherzellen vorhanden (Abb. 13). Es kann daher angenommen werden, dass die Mukusschicht auf dem Epithel noch vorhanden war. Überprüfbar wäre diese These durch eine Anfärbung der Mukopolysaccharide mittels PAS-Reaktion (engl. Periodic acid-Schiff reaction). Eine intakte, dem Epithel aufliegende Mukusschicht kann eine übermäßige Translokation luminaler Antigene über das Epithel verhindern und die Stimulation residenter Zellen unterbinden.

Ein weiterer Wirkmechanismus, der für Resormin vorstellbar wäre, ist die Modulation des pH-Milieus, denn eine extrazelluläre Azidose und der damit verbundene pH-Abfall ist eine typische Begleiterscheinung im entzündeten Gewebe [315, 316, 317]. Grund ist der erhöhte Verbrauch von Sauerstoff durch migrierende und Phagozytose-betreibende Neutrophile und Makrophagen [318]. Die umliegenden Zellen passen sich aufgrund des anaeroben Milieus ihren Metabolismus an, es kommt zur vermehrten Akkumulation saurer Stoffwechselendprodukte wie zum Beispiel Laktat und der pH-Wert des entzündeten Bereichs sinkt [319]. Dies konnte auch im Kolon und im Stuhl von CU-Patienten nachgewiesen werden, wobei in Patienten mit einer aktiven CU die niedrigsten pH-Werte gemessen wurden [319, 320]. Demzufolge wäre auch für das Kurzzeitschädigungsmodell ein Abfall des pH-Wertes im perfundierten Segment möglich. Da Resormin basisch ist, wäre eine Modulation des pH-Milieus denkbar und hätte laut verschiedener Studien Einfluss auf die Zellinfiltration sowie die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen [321, 322]. Zum einen konnte für Neutrophile gezeigt werden, dass deren Fortbewegung/Lokomotion innerhalb eines pH-Gradienten zum azidotischen Milieu gerichtet war [323]. Des Weiteren wurde für Neutrophile unter extrazelluläre Azidose eine gesteigerte Aktivierung und Aktivität sowie eine verminderte Apoptoserate nachgewiesen [324]. Shi et al. konnten *in vitro* eine

pH-Abhängigkeit für die IL-8-Expression durch humane Epithelzellen nachweisen [321]. So förderte eine milde Azidose nicht nur die IL-8-Expression, sondern steigerte ebenfalls die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Auch für IL1 β wurde ähnliche Effekte nachgewiesen [322]. Ein Nachweis dieser Zytokine im Kurzzeitschädigungsmodell würde zur Klärung dieses Sachverhaltes beitragen.

5.3 Der Einfluss der Friedländer Silikate auf humane intestinale Epithelzellen *in vitro*

Nachdem im Kurzzeitschädigungsmodell ein therapeutisches Potential für Resormin nachgewiesen werden konnte, sollten die zugrunde liegenden molekularen Wirkmechanismen für den therapeutischen Effekt von Resormin in Zellkulturexperimenten analysiert werden. Zusätzlich wurden zwei weitere Silikat-Modifikationen untersucht.

Die vielfältigen Wirkmechanismen über die Silikate im Allgemeinen ihr therapeutisches Potential vermitteln, wurden oben bereits ausführlich diskutiert. Im Fokus der *in vitro*-Studien lagen jedoch die Epithelzellen, was auf das experimentelle Design zurückzuführen war. Zum einen vermittelte IA - wie alle chemischen Noxen, die zur experimentellen Induktion einer Kolitis verwendet werden - seine Toxizität primär auf Epithelzellen. Zum anderen sind Epithelzellen dem Lumen zugewandt und somit in räumlicher Nähe zum perfundierenden Resormin.

5.3.1 Toxizitätspotential

Zunächst wurden alle drei Silikate auf ein mögliches Toxizitätspotential hin getestet. Denn trotz der Verwendung von Resormin als Futtermitteladditiv sowie seines Einsatzes bei der Therapie von Durchfall- und Refluxerkrankungen erfolgte bis zum damaligen Zeitpunkt keine Untersuchung des Silikats in der Zellkultur. Die Inkubation von SW480- und Caco-2-Zellen mit unterschiedlichen Tonmineralien hatte nach 24 Stunden keinen nennenswerten Einfluss auf die Vitalität und Proliferation der Epithelzellen (Abb. 17 und 18). Diese Ergebnisse bestätigten die Literaturdaten hinsichtlich der guten Verträglichkeit sowie des kaum vorhandene Nebenwirkungsspektrums für Silikate im Allgemeinen [196, 199, 201]. Lediglich nach 48 Stunden Inkubation konnte ein Vitalitätsabfall bei den Caco-2-Zellen beobachtet werden (Abb. 18). Eine mögliche Erklärung wäre die Bindung von essentiellen Nährstoffen und Wachstumsfaktoren aus dem Medium an den Ton aufgrund seines starken Absorptionspotentials. Allerdings kann im klinischen Alltag eine dauerhafte Exposition der Darmepithelzellen mit dem Ton ausgeschlossen werden, da sich der Kontakt auf die Dauer der normalen Darmpassage, etwa 12 bis 24 Stunden, beschränkt. Jedoch sollte aufgrund dieser Ergebnisse und im Hinblick auf die orale Applikation eine genaue Analyse möglicher Bindungspartner des Silikats angestrebt werden. Somit kann bei therapeutischer Indikation im Zweifelsfall eine Supplementierung zur Vorbeugung von Mangelerkrankungen erfolgen.

5.3.2 Wirkung auf Zytokine

Die *in vitro*-Stimulation von Epithelzellen mit Mediatoren wie IL1 β , TNF α , IFN γ oder LPS, welche mit der CU-Pathogenese einhergehen, simuliert das *in vivo*-assoziierte inflammatorische Milieu. Als Folge dieses pro-inflammatorischen Stimulus sind Epithelzellen ebenfalls zu einer pro-inflammatorischen Reaktion befähigt [210, 224]. Diese Befunde verdeutlichen die Problematik des sich selbst unterhaltenden Zytokinsturmes in der CU-Pathogenese.

In den eigenen Stimulationsversuchen konnte gezeigt werden, dass der ZC + LPS eine signifikant verstärkte MCP-1- und IL-8-mRNA-Expression in Caco-2- und SW480-Zellen induzierte (Daten nicht gezeigt). Die beiden untersuchten Reporter werden unter physiologischen Bedingungen nur wenig exprimiert, während pro-inflammatorische Stimuli wie Zytokine, bakterielle und virale Produkte sowie oxidativer Stress zu einem raschen Anstieg der IL-8- und MCP-1-Expression führen [325, 326]. Da sich beide Zelllinien jedoch in ihrem Differenzierungsgrad unterscheiden, war der Anstieg in den nur moderat differenzierten SW480-Zellen um ein Vielfaches höher. Caco-2-Zellen als Modell der intestinalen Zellproliferation und –differenzierung entlang der Krypt-Villi-Axe erlangen im Zuge ihrer Weiterkultivierung nach Konfluenz den Status einer vollständig ausdifferenzierten Epithelzelle, wie sie im apikalen Zottenbereich des Darms zu finden ist. Diese Zellen sind gegenüber inflammatorischen Stimuli weniger sensitiv, was auf eine verminderte Expression von Rezeptoren auf ihrer Oberfläche und veränderten intrazellulären Signalkaskaden zurückzuführen ist [327, 328]. Um eine mögliche Zytokin-Bindung als zugrundeliegenden therapeutischen Wirkmechanismus durch die Tonmineralien zu prüfen, wurden ZC + LPS-stimulierte Epithelzellen mit den Tonsuspensionen kokultiviert. Dabei konnte lediglich im Fall von MCP-1 bei den sensibler reagierenden SW480 eine signifikante Abnahme beobachtet werden (Abb. 19D).

Eine mögliche Ursache für dieses Ergebnis könnte die Bindung von TNF α an den Ton sein. Dies konnten kürzlich Zychowski et al. *in vitro* für ein dioktaedrisches Silikat nachweisen [302]. Dass die TNF α Abreicherung bei den Caco-2-Zellen zu keinen messbaren Veränderungen führte, könnte in den synergistischen Effekten der verbliebenen Zytokine begründet sein [210]. Eine weitere Möglichkeit ist die Bindung von LPS an die Silikate. Als Folge wäre die TLR4-abhängige NF- κ B-Aktivierung vermindert oder - bei kompletter LPS-Bindung - gänzlich unterbunden. Für Caco-2-Zellen hatte die LPS-Bindung aus dem ZC + LPS keinen Einfluss. Aufgrund ihrer höheren Differenzierung zeigte sich ihre geringe Responsivität auch in LPS-Stimulationsversuchen, bei der erst Konzentrationen > 1 mg/ml zur einer messbaren Reaktion führten (eigene Arbeiten). Aus diesem Grund trugen die geringen LPS-Konzentrationen im ZC + LPS nicht zur erhöhten IL-8- und MCP-1-Expression bei. Als weiterer Parameter, neben dem mRNA-Expressionsprofil von IL-8 und MCP-1, fungierte die Proteinsekretion von IL-8 (Abb. 20). Analog zu den mRNA-Expressions-Daten

resultierte die ZC + LPS-Stimulation in den Zelllinien auch in einer gesteigerten IL-8-Sekretion. Ebenso exprimierten die SW480-Zellen mehr IL-8 (Abb. 20B). Die Koinkubation stimulierter Zellen mit den Tonsuspensionen führte in beiden Zelllinien zu keiner signifikanten Beeinflussung der IL-8-Sekretion. Somit kann eine IL-8-Bindung an die Tonminerale ausgeschlossen werden.

Ein weiterer wichtiger Untersuchungsgegenstand in diesem Zellkulturexperiment waren die Tonsuspensionen selbst. Aufgrund ihres terrestrischen Ursprungs sind die Tonminerale mit LPS kontaminiert und hätten demzufolge selbst einen pro-inflammatorischen Stimulus darstellen können. Diese These konnte widerlegt werden, da in beiden Zelllinien nur sehr geringe Expressionsänderungen gemessen wurden, die im Vergleich zum ZC + LPS signifikant vermindert waren (Abb. 19 und 20). Somit vermitteln die Tonsuspensionen kein pro-inflammatorisches Potential auf intestinale Epithelzellen.

Ob die Bindung von Zytokinen für die beobachteten Expressionsänderungen verantwortlich war, muss in weiterführenden Untersuchungen analysiert werden. Auch wenn zum momentanen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden kann, dass Tonsuspensionen TNF α binden, so legen die *in vitro*-Daten nahe, dass der Therapie-Erfolg im Kurzzeitschädigungsmodell nicht ausschließlich auf die Bindung von pro-inflammatorischen Zytokinen zurückzuführen war. Es könnten somit zusätzliche Mechanismen beim therapeutischen Effekt des Tonminerals eine Rolle spielen.

5.3.3 Wirkung auf die intestinale Barriere

Die gestörte Epithelzellbarriere, als Folge des entzündungsbedingten Zytokinsturms, ist ein wesentliches Merkmal der CU-Pathogenese. Die erhöhte Translokation luminaler Antigene über das Epithel führt zur übermäßigen Stimulierung von Immunzellen und trägt wesentlich zur Chronifizierung der mukosalen Entzündung bei. Deshalb könnte die Wiederherstellung der epithelialen Barriere durch eine direkte Intervention von luminaler Seite einen positiven Therapieeffekt vermitteln und stand folglich im Fokus der nachfolgenden Zellkulturversuche. Inwiefern die dem Epithel aufliegende Mukusschicht die Interaktion zwischen Epithelzellen, pro-inflammatorischer Stimuli und Tonsuspensionen beeinflusst hätte, kann im Rahmen der durchgeführten Experimente nicht beurteilt werden, da die Caco-2-Zellen keinen Mukus exprimieren. Dafür müssten weitere Untersuchungen an einer Epithelzelllinie mit Becherzell-Charakter, wie die HT29-MTX, durchgeführt werden [329].

Der Einfluss der Tonsuspensionen auf die Epithelzellen und deren Integrität wurde in einem Kokulturmodell untersucht. Hierbei bilden Caco-2-Zellen durch die Kultivierung auf einer semipermeablen Membran einen dichten, differenzierten Zellverband mit einer mukosalen und einer serosalen Seite aus. Dies ermöglichte die Stimulation von basaler Seite, während parallel die Tonsuspension apikal appliziert werden konnte. Des Weiteren konnte die Integrität des Caco-2-Monolayers mittels TEER charakterisiert werden. Es zeigte sich

hierbei, dass die basale Stimulation mit TNF α zur signifikanten Reduktion des epithelialen Widerstandes führte, in ähnlicher Höhe, wie es auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurde (Abb. 22A) [330, 331]. Ursächlich für diesen Barrierschaden war die direkte Beeinflussung von TJ-Proteinen durch TNF α [332, 333]. Des Weiteren agiert TNF α auch indirekt auf den Epithelzellverband. So zeigten Sonnier et al., dass Caco-2-Zellen als Reaktion auf den basalen TNF α -Stimulus das Chemokin MCP-1 sowohl basal als auch apikal sekretierten [334]. MCP-1 wiederum ist genauso wie TNF α an der Manifestation eines Epithelzellschadens beteiligt. Dies zeigte sich in Endothelzellen, welche MCP-1 ausgesetzt waren, durch eine Reduktion des TEERs, eine erhöhte Permeabilität für Makromoleküle sowie Veränderungen in den TJ-Proteinen [335, 336, 337]. In HT-29-D4-Zellen konnten Vallee et al. nach basaler TNF α -Stimulation eine erhöhte basale und apikale IL-8-Expression nachweisen [338]. Analog zur MCP-1 konnten auch für IL-8 barrierschädigende Effekte nachgewiesen werden [339, 340]. Da HT29-D4-Zellen ebenfalls eine für Enterozyten typische Differenzierung zeigen, wären ähnliche Effekte in den Caco-2-Zellen möglich. Auch wenn sich die Ergebnisse für MCP-1 nur auf Untersuchungen in Endothelzellen beschränken, so ist es sehr wahrscheinlich, dass dieselben Effekte auch in Epithelzellen vermittelt werden. Die Aufrechterhaltung der Barriere im Endothel und im Epithel wird in beiden Zelltypen durch Junction-Proteine vermittelt. Des Weiteren sind Epithelzellen im Besitz der notwendigen Chemokin-Rezeptoren CXCR1 für IL-8 und CCR-2 für MCP-1 [341, 342, 344]. Dieser autokrine bzw. parakrine Regelmechanismus ist verantwortlich für die Vielfalt der synergistischen Effekte von Zytokinen während einer Entzündung und erklärt den massiven Zytokinsturm innerhalb der CU-Pathogenese.

Ein weiterer experimenteller Ansatz in diesem Kokultur-Modell war die basale Stimulation mit THP-1-Makrophagen. Die räumliche Nähe von Caco-2-Zellen und Immunzellen stellt eine Annäherung an die *in vivo*-Situation da. Im Einklang mit anderen Studien resultierte auch diese Kokultur in einem verminderten Widerstand (Abb. 22B) [215, 343]. Verantwortlich für diesen Effekt waren die THP-1-Zellen, welche sich im Zuge der PMA-induzierten Differenzierung in einen aktivierten Makrophagen-ähnlichen Phänotyp umwandelten und eine Vielzahl von Mediatoren sekretierten. Dazu zählen in hohen Mengen TNF α und IL-8 aber auch IL-1 β , IL-6 und IFN γ [215, 343]. Sowohl TNF α als auch IFN γ tragen wesentlich zur direkten Degeneration der intestinalen epithelialen Barriere bei [73, 344, 345]. Zusätzlich vermittelte TNF α auch in diesem Ansatz die oben beschriebenen indirekten Effekte auf das Epithel. Satsu et al. konnten durch die Kokultur mit THP-1-Makrophagen auch eine erhöhte Apoptose- und Nekroserate in den Caco-2-Zellen beobachten [215]. Für apoptotische Zellen ist bekannt, dass sie im Epithelzellverband ebenfalls zum Verlust der Integrität beitragen, da diese Zellen im Zuge der Apoptose schrumpfen und somit Löcher („Leaks“) im Monolayer erzeugen, was eine TEER-Reduktion zur Folge hätte [346, 347]. Die Untersuchung des Caco-Monolayers auf apoptotische Zellen mittels Propidium, ein Farbstoff der durch impermeable Zellmembranen diffundiert und mit der DNA interkaliert, könnte Hinweise

darauf geben, ob diese Zellen mit verantwortlich für die gemessenen TEER-Reduktionen waren.

Im Zuge der PMA-induzierten Differenzierung kommt es neben der erhöhten Sekretion an pro-inflammatorischen Zytokinen auch zu einer verstärkten ROS-Produktion durch die Makrophagen [348]. Die ROS-Akkumulation in das Medium führt einerseits zu direkten Epithelzellschäden und induziert andererseits die Expression weiterer pro-inflammatorischer Zytokine [349, 350]. Neben ROS sind auch reaktive Stickstoffspezies (R-NOS) hoch reaktiv und verursachen nitrosativen Stress, der für Gewebeschäden verantwortlich ist. Vor diesem Hintergrund ist besonders die Studie von Chavez et al. interessant, welche in Caco-2-Zellen einen erhöhten Stickstoffmonoxid (NO)-Gehalt nach Stimulation mit einem ZC bestehend aus IFN γ , IL1 β und TNF α nachweisen konnten [351]. Neben den Caco-2-Zellen reagieren auch die THP-1 Makrophagen auf pro-inflammatorische Stimuli mit einer erhöhten NO-Produktion [352]. Somit trugen beide Zellpopulationen als Folge der Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen durch THP-1-Makrophagen zur Akkumulation von R-NOS bei. Diese zusätzlichen Effekte, welche durch die THP-1-Makrophagen vermittelt wurden, beeinflusste die Permeabilität des Caco-2-Monolayers mehr als TNF α alleine und erklärt die höheren TEER-Verluste.

Die Koinkubation mit den Tonsuspensionen konnte in beiden Versuchsansätzen die Stimuli-induzierte TEER-Reduktion verhindern (Abb. 22). Aufgrund des experimentellen Designs, welches die Situation im Kurzzeitschädigungsmodell und *in vivo* widerspiegeln sollte, hatten die Tonsuspensionen jedoch keinen direkten Kontakt zum basalen Kompartiment. Somit konnte der Ton zu Beginn der Ko-Inkubation nur mit Stoffen interagieren, die entweder von den Caco-2-Zellen apikal sezerniert wurden, oder die aufgrund der zunehmenden Permeabilität von basal nach apikal diffundierten. Von Caco-2-Zellen ist bekannt, dass sie auf basale Stimuli auch nach apikal reagieren. So belegten Studien, dass die basale Exposition gegenüber einem Mix aus pro-inflammatorischen Zytokinen in einer basalen und apikalen IL-6-, IL-8- und MCP-1-Expression resultierte [224, 334]. Somit wäre im Ko-kulturmodell die Bindung von apikal sezernierten Zytokinen an die Tonsuspensionen ein vorstellbarer Wirkmechanismus, der nachfolgende autokrine Reaktionen unterbinden könnte. Eine genaue Analyse des apikalen Mediums könnte Aufschluss darüber geben, welche Zytokine an die Tonsuspensionen gebunden werden. Ob die Bindung der apikal sezernierten Zytokine an die Tonsuspensionen alleine schon ausreichend war, um die Integrität des Monolayers zu gewährleisten, kann mit den vorliegenden Ergebnissen nicht beantwortet werden. Dafür hätten die Widerstandsänderungen innerhalb der 24-stündigen Inkubation zu verschiedenen Zeitpunkten dokumentiert werden müssen. Es ist jedoch anzunehmen, dass TNF α oder THP-1-Makrophagen den Integritätsverlust parallel von basaler Seite induzierten und somit die Permeabilität des Caco-2-Monolayers erhöhten. Folglich konnten Zytokine, aber auch ROS und R-NOS, welche durch THP-1-Makrophagen oder Caco-2-Zellen in das

basale Kompartimente sezerniert wurden, in das apikale Kompartiment diffundieren und hier an die Tonsuspensionen gebunden werden. Somit wäre die Abreicherung dieser pro-inflammatorischen Mediatoren aus dem Zellkulturmedium für den gemessenen TEER-Anstieg verantwortlich. Ein vergleichbares TEER-Ergebnis konnte auch bei Inkubation der Caco-2-Zellen mit den Tonsuspensionen allein gemessen werden (Abb. 21). Dieser Effekt war so nicht zu erwarten, denn die Proliferations- und Vitalitäts-Untersuchungen lieferten kein Indiz für einen derartigen stimulierenden Einfluss. Ob die Tonsuspensionen endogene Abbauprodukte der Caco-2-Zellen oder Bestandteile des Mediums banden und deren Abreicherung einen barrierestärkenden Effekt zur Folge hatte, kann nur spekuliert werden. Jedoch zeigten Studien, dass die Permeabilität eines Caco-2-Monolayers unabhängig von pro-inflammatorischen Stimuli auch durch verschiedene Calcium- oder Glukose-Konzentrationen im Zellkulturmedium beeinflusst werden konnte [353]. In weiteren Untersuchungen könnte die Nennung aller potentiellen Ton-Bindungspartner zur Aufklärung der dem Therapieerfolg zugrundeliegenden Wirkmechanismen beitragen.

Die in Verarbeitungsprozessen durchgeführten Modifikationen an den Tonmineralien sollten funktionslose, nicht-quellfähige Nichttonminerale abreichern und gleichzeitig die Oberfläche vergrößern. Neben Resorbin mit einer durchschnittlichen Teilchengröße von $< 15 \mu\text{m}$ entstanden so Tonmineralien mit einer durchschnittlichen Größe von $< 5 \mu\text{m}$ und $< 2 \mu\text{m}$. Die beiden zusätzlichen Modifikationen zeichneten sich deshalb durch vermehrte Bindungsstellen für mögliche potentiell anti-inflammatorische Mediatoren aus.

Die Ergebnisse aller *in vitro*-Versuche zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei eingesetzten Tonmineralien. Dieses Ergebnis steht somit nicht im Einklang mit den oben bereits vielfältig diskutierten Wirkmechanismen. Vielmehr wäre eine Korrelation zwischen den Messergebnissen und der durchschnittlichen Teilchengröße zu erwarten gewesen, da die Modifikation der Tonmineralien neue Bindungsstellen geschaffen hatte.

Ein möglicher Grund für diese Beobachtungen könnte die zu geringe Konzentration von pro-inflammatorischen Bindungspartnern im umgebenden Medium sein. In eigenen LPS-Bindungsstudien wurde für die drei Tonmineralien ein sehr hohes Absorptionspotential nachgewiesen. So konnten LPS-Konzentrationen von 1000 ng/ml durch eine 10%ige Tonsuspension zu 99,9 % gebunden werden. Andere Bindungsstudien mit Adsorber-Konzentrationen von lediglich 0,02-0,4 % wiesen ebenfalls eine 100%ige Bindung von Mykotoxinen nach [207]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Konzentrationen an LPS, Zytokinen und reaktiven Metaboliten zu niedrig waren, als dass Unterschiede bezüglich des Bindungspotentials zwischen den drei Modifikationen nachweisbar wären.

Um die maximale Bindekapazität der Tonsuspensionen zu ermitteln, müssten diese mit den einzelnen pro-inflammatorischen Stimuli inkubiert werden. Dabei sollten die Ergebnisse zur

Mykotoxin-Bindekapazität berücksichtigt werden und nur sehr geringe Adsorber-Konzentrationen eingesetzt werden.

Zusammenfassend zeigen die Daten aus den *in vitro*-Versuchen, dass von den Tonsuspensionen kein Toxizitätspotential ausging und sie das Expressionsverhalten und die Permeabilität von Epithelzellen beeinflussten, was vermutlich auf die Bindung von pro-inflammatorischen Zytokinen und reaktiven Metaboliten zurückzuführen war.

5.4 Putativer Wirkmechanismus von Resormin unter Berücksichtigung der *in vitro*-Daten

In den vorliegenden Experimenten sowie in der Literatur gibt es zahlreiche Hinweise auf das therapeutische Potential von Silikaten im Allgemeinen und Resormin und seine Modifikationen im Besonderen.

Zur Aufklärung der dem Therapieeffekt von Resormin zugrundeliegenden Wirkmechanismen wurde in der Zellkultur zum einen die Bindung von Zytokinen an die Tonmineralien überprüft. Dabei konnte für IL-8 eine Bindung ausgeschlossen werden. Für das Chemokin MCP-1 kann eine Bindung nicht ausgeschlossen werden. Hier hätte durch die Analyse des Zellkulturüberstandes eine klare Aussage getroffen werden können. Ob TNF α und/oder weitere Zytokine gebunden werden, sollte in weiterführenden Analysen untersucht werden.

Weiterer Untersuchungsgegenstand in der Zellkultur war der Einfluss auf die epitheliale Barriere. Die Untersuchungen der Widerstandsmessungen belegten, dass die Koinkubation mit Resormin die Stimulus-induzierte Reduktion des TEERs positiv beeinflusste. Als Ursache für diesen barrierestärkenden Effekt kann die Bindung von pro-inflammatorischen Zytokinen sowie von reaktiven Metaboliten an Resormin angenommen werden.

Die Abreicherung von ROS durch das Resormin kann aufgrund des im Kapitel 1.5.3 bereits erwähnten hohen Überschusses von Fe²⁺ gegenüber Fe³⁺ in der mineralischen Matrix als putativer Wirkmechanismus angesehen werden. Dafür sprechen indirekt auch tierexperimentelle Daten von Wang et al., welche unter Smektit-Therapie eine verminderte MPO-Aktivität nachgewiesen haben [303]. MPO ist ein Indikator für die Phagozytoseaktivität von neutrophilen Granulozyten und Monozyten und katalysiert die Generation von Hypochlorid unter Verbrauch von H₂O₂. Die Akkumulation von ROS durch zirkulierende und migrierende Neutrophile wie Granulozyten und Makrophagen als Reaktion auf das pro-inflammatorische Milieu ist ein klassischer Prozess in der CU-Pathogenese und wesentlich an der Entstehung von Gewebeschäden beteiligt [354]. Eine erhöhte ROS-Produktion konnte in der entzündeten Mukosa von CU-Patienten nachgewiesen und ebenso für das DSS-Kolitis-Modell gezeigt werden [355, 356, 357]. Allerdings fehlen entsprechende Untersuchungen für die in der Literatur beschriebenen IA-Modelle. Im Kurzzeitschädigungsmodell sprechen Infiltrationen mit Neutrophilen in das entzündete Gewebe, wie sie in der Histologie beobachtet wurden, für eine erhöhte Akkumulation von

ROS. Demzufolge wäre eine Abreicherung von ROS durch die Gabe von Antioxidantien eine mögliche Therapieoption. Resormin ist aufgrund seines Überschusses an Fe^{2+} zur Bindung von Sauerstoff-Anionen fähig und könnte H_2O_2 mittels Fe^{2+} inaktivieren. Diese Reaktionsgleichung entspricht der Fenton-Reaktion, die einen Schutzmechanismus der Zellen bei oxidativem Stress darstellt. Diese Fähigkeit wäre insbesondere in der akuten Phase der Entzündung, wie sie im Kurzzeitschädigungsmodell dargestellt wurde, ein effektiver Wirkmechanismus. Zum ersten könnten massive Gewebeschäden durch extrazellulär vorliegendes ROS vermindert werden. Dafür würden die histologischen Befunde, wie weniger Zelldebris und weniger nekrotische Zellen im Gewebe, sprechen (Abb. 13). Zum zweiten würde die ROS-assoziierte NF- κ B-Aktivierung vermindert werden [350, 358]. Als Reaktion verändert sich die Expression von Zytokinen und Chemokinen durch residente Zellen wie Makrophagen oder Epithelzellen, was durch die erhöhte IL-10 sowie die verminderte MCP-1 mRNA-Expression belegt wurde (Abb. 16). Für beide Mediatoren wurden *in vitro* barrieremodulierende Eigenschaften nachgewiesen, wobei IL-10 die Barriere stärkt, während MCP-1 die Barriere herabsetzt [335, 359]. Die Verschiebung des Zytokinmilieus zugunsten anti-inflammatorisch wirksamer Zytokine beeinflusst wiederum die Expression von TJ-Proteinen und stärkt die epitheliale Barriere. Dies wurde durch die TEER-Messungen in der Zellkultur belegt (Abb. 22). Eine verminderte Expression von Chemokinen hat einen Einfluss auf das Migrations- und Infiltrationsverhalten von Neutrophilen und korreliert somit mit der Abnahme CD68^+ Zellen nach Resormin-Perfusion im Kurzzeitschädigungsmodell (Abb. 15).

6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit stand die Etablierung eines tierexperimentellen Modells im Mittelpunkt, das neue Einblicke in die Genese der CU-Erkrankung sowie die Testung neuer Therapiestrategien möglich machen sollte. Deshalb sollte das experimentelle Design so gewählt werden, dass das Darmsegment leicht zugänglich war und die Operation am Versuchstier möglichst minimal invasiv durchgeführt werden konnte. Unter Berücksichtigung der Lokalisation der humanen CU ist eine Weiterentwicklung des Kurzzeitschädigungsmodells auch im Kolon eine logische Konsequenz. Zur Analyse von frühen Zellinfiltraten sowohl myeloischer als auch lymphoider Herkunft ist eine Extension der Perfusionszeit notwendig. Dies erhöht allerdings die Anforderung an die Kontrolle der Narkose, um die Gesundheit der Versuchstiere im Experiment sicherzustellen. Im Fokus weiterer Fortentwicklung des Kurzzeitschädigungsmodells sollte eine detaillierte Analyse der IA-induzierten Entzündung stehen. Eine erhöhte intestinale Permeabilität gilt als einer der entscheidenden Auslösefaktoren für eine CU. Mithilfe des Kurzzeitschädigungsmodells könnte ebenfalls der Einfluss der luminalen Flora auf die mukosale Entzündung sowie deren Interaktion mit applizierten Therapeutika analysiert werden.

Der Therapieerfolg von Resormin im Kurzzeitschädigungsmodell rechtfertigt auch dessen Einsatz in einem Langzeit-Kolitis-Modell. Hier sollten verschiedene Parameter wie Gewichtsverlust, Stuhlkonsistenz oder okkultes Blut untersucht werden, die eine Aussage über den Krankheitsverlauf erlauben würden. Des Weiteren könnte dann auch sowohl ein therapeutischer als auch prophylaktischer Ansatz gewählt werden.

In ersten Voruntersuchungen unter Anwendung des DSS-Kolitis-Modells konnte bereits ein Therapieeffekt der Friedländer Tonminerale gezeigt werden. Sowohl im therapeutischen als auch im prophylaktischen Ansatz zeigte die Tonmineral-Gruppe einen milderen Krankheitsverlauf. In Übereinstimmung mit dem Kurzzeitschädigungsmodell konnte ein allerdings nicht signifikant erniedrigter histologischer Score im Vergleich zur unbehandelten Tiergruppe gezeigt werden. Weitere Untersuchungen sind hier erforderlich, um den Therapieeffekt statistisch abzusichern.

In Zellkulturexperimenten mit humanen intestinalen Epithelzellen konnte ein positiver Effekt der Friedländer Tonminerale auf den transepithelialen Widerstand gezeigt werden. Hier sind weitere Untersuchungen erforderlich, um die molekularen Wirkmechanismen zu verstehen, die die Barrierefunktion des Kolons erhöhen. Insbesondere eine Analyse der TJ-Proteine sollte durchgeführt werden.

Ein anderer Erklärungsansatz zur Wirksamkeit der Friedländer Tonminerale bedarf ebenfalls der Verifikation. Friedländer Tonminerale sind im Unterschied zu anderen Silikaten reich an Eisen-Ionen der Oxidationsstufe + 2. Da oxidativer Stress ebenfalls eine zentrale Rolle in der

Pathogenese der CU spielt, könnte ein anti-oxidativer Effekt für den Therapieerfolg verantwortlich sein.

Des Weiteren konnte in Voruntersuchungen gezeigt werden, dass die Friedländer Tonminerale Endotoxine adsorbieren. Im Hinblick auf deren großes pro-inflammatorisches Potential und vor dem Hintergrund der erhöhten Permeabilität des entzündeten Kolons könnte dies einen additiven Effekt für die Therapie der CU darstellen.

Schließlich zeigen Tonminerale eine große Vielfalt und weisen klassenspezifische Eigenschaften auf. Deshalb sollten andere Tonminerale ebenfalls auf ihr therapeutisches Potential im Kurzzeitschädigungsmodell untersucht werden.

7 Zusammenfassung

Die Ätiologie der Colitis Ulcerosa ist trotz jahrzehntelanger Forschung nicht vollständig aufgeklärt. Neben genetischer Prädisposition und Ernährungsgewohnheiten wird besonders eine gestörte Integrität der intestinalen Mukosa-Barriere in der CU-Pathogenese diskutiert. Die bisherigen Therapiestrategien sind aufgrund ihrer Toxizität und des gesteigerten Karzinomrisikos für eine Langzeitbehandlung nicht geeignet. Deshalb stellen zum einen weitere Untersuchungen zur Genese der CU und zum anderen die Erforschung neuartiger Therapien wichtige Forschungsfelder in der Zukunft dar.

Es existiert eine Vielzahl von tierexperimentellen Modellen für die CU, die sich hinsichtlich Induktion, Ätiologie, Erkrankungsschwere und Dauer unterscheiden. Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahren kann keines der bekannten Modelle die Ätiologie und Pathologie der CU umfassend nachbilden. Vielmehr werden in den jeweiligen Methoden lediglich einzelne Aspekte der CU-Pathogenese abgebildet. Trotzdem sind tierexperimentelle Modelle von großer Relevanz, da die Komplexität der Erkrankung mittels Zellkulturmodellen nicht ausreichend abgebildet werden kann. Des Weiteren sind Studien an Menschen aus ethischen Gründen nur eingeschränkt zulässig. Darum stellen Tiermodelle wichtige Werkzeuge der CU-Grundlagenforschung dar, denn mit ihrer Hilfe können Hypothesen über die Ursache und den Verlauf von CU sowie Therapiestrategien und deren Wirksamkeit überprüft werden.

Die bisherigen tierexperimentellen Modelle sind weiterhin dadurch limitiert, dass Untersuchungen zur Pathogenese bzw. zur Wirksamkeit von Therapeutika bei den klassischen experimentellen Kolitiden in der Regel erst einige Tage nach Kolitis-Induktion durchgeführt werden können. Ein tierexperimentelles Modell, das eine Untersuchung der frühen mukosalen Entzündungsmechanismen und das schnelle Screening von potentiell neuen Therapeutika ermöglicht, würde neue Einblicke in die Genese der Erkrankung sowie in die Testung neuer Therapiestrategien möglich machen.

Das Ziel der Arbeit war deshalb die Etablierung eines experimentellen Modells, das als Versuchs- und Testsystem zum Studium der frühen Pathogenese von CU und zur Evaluation neuartiger Therapieoptionen fungieren sollte.

In dem in dieser Arbeit etablierten Kurzzeitschädigungsmodell wurde die mukosale Entzündung durch eine *in situ*-Perfusion eines definierten Dünndarmsegmentes mit dem Sulfhydryl-Blocker IA innerhalb kürzester Zeit induziert. Als Resultat konnte anschließend ein histologisch stark entzündeter Darm, eine erhöhte Expression von inflammatorischen Zytokinen und eine reduzierte Expression des defence-Faktors iAP, sowie eine erhöhte Infiltration von CD68⁺ Zellen analysiert werden. Die IA-induzierte Entzündung war dabei auf das perfundierte Darmsegment beschränkt.

Nach der erfolgreichen Etablierung konnte die in der Literatur beschriebene Wirksamkeit der beiden klinisch relevanten CU-Therapeutika Dexamethason und Mutaflor auf die mukosale Entzündung im Kurzzeitschädigungsmodell verifiziert werden. Die Entzündungsparameter waren unter beiden Therapeutika signifikant gegenüber den unbehandelten Tieren verbessert.

Die Analyse der Resormin-behandelten Tiere zeigte erstmals die Wirksamkeit des Silikats in der Therapie der entzündlichen Darmerkrankungen. Nach Therapie waren der histologische Score signifikant vermindert, die Expression der inflammatorischen Zytokine und des defence-Faktors iAP moduliert und die Infiltration der CD68⁺ Zellen reduziert. Der Therapieeffekt von Resormin war, verglichen mit den klinisch relevanten CU-Therapeutika, größer.

Zusammenfassend konnten im Kurzzeitschädigungsmodell die Beobachtungen aus den experimentellen Kolitis-Modellen und der humanen CU hinsichtlich der induzierten histologischen und molekularbiologischen Veränderungen verifiziert werden. Die Daten belegen, dass das Kurzzeitschädigungsmodell für die Analyse früher Prozesse in der mukosalen Entzündung geeignet ist. Trotz des kleineren Zeitfensters zwischen Entzündungs-Induktion und Therapie-Applikation konnten im Modell belastbare Aussagen hinsichtlich möglicher Therapieeffekte gemacht werden. Das experimentelle Design zeigte sich als gut reproduzierbar und die Wirksamkeit potentieller Therapeutika konnte innerhalb weniger Stunden analysiert werden. Dabei sind die Belastungen für die Versuchstiere aufgrund des experimentellen Designs im Vergleich zu den klassischen Langzeit-Kolitis-Modellen um ein Vielfaches reduziert. Aus diesem Grund ist das Modell für die Evaluation neuartiger Therapieverfahren bei der Behandlung von CU bestens geeignet.

Im zellbiologischen Teil dieser Arbeit konnten die dem Therapieeffekt von Resormin zugrundeliegenden Wirkmechanismen analysiert werden. Eine Stimulation der humanen intestinalen Epithelzelllinie SW480 mit pro-inflammatorischen Zytokinen und LPS in Gegenwart der Tonsuspensionen führte zu einer signifikanten Reduktion der MCP-1 Expression. In differenzierten Caco-2-Zellen führte die Behandlung mit Tonsuspensionen zu einem Anstieg des transepithelialen Widerstandes. Wurden die differenzierten Caco-2-Zellen zusätzlich mit TNF α oder THP-1-Makrophagen stimuliert, reduzierte die simultane Koinkubation mit den Tonsuspensionen die Abnahme des transepithelialen Widerstandes signifikant. Des Weiteren konnte mithilfe von Vitalitätsanalysen an den humanen intestinalen Epithelzelllinien SW480 und Caco-2 gezeigt werden, dass die Tonminerale kein Toxizitätspotential besitzen. Diese Daten weisen darauf hin, dass der therapeutische Effekt der Silikate *in vitro* und im Kurzzeitschädigungsmodell auf die Bindung von pro-inflammatorischen Zytokinen und reaktiven Metaboliten zurückzuführen ist. Es sind allerdings weitere Analysen in der Zukunft erforderlich, um das therapeutische Potential der Tonminerale auf molekularer Ebene aufzuklären.

8 Summary

The pathogenesis of Ulcerative Colitis (UC) has not yet been elucidated sufficiently. In addition to genetic predisposition and dietary habits, particularly a disrupted integrity of the intestinal mucosal barrier in the UC-pathogenesis is discussed. Currently available therapeutic options are not suitable for long term treatment due to their toxicity and increased cancer risk. Therefore, further research on the pathogenesis of UC and the exploration of novel therapies represent an important research field.

Numerous animal models for UC are available, and they differ regarding the induction, aetiology, severity and duration of the disease. Despite extensive research during the last years none of these known animal models can sufficiently represent the complex aetiology and pathology of CU. Rather, single aspects of the UC pathology are reflected in the respective models. Nevertheless are animal models of great relevance, because they are more complex than cell culture models. Furthermore, for ethical reasons human studies are rarely an option. Therefore animal models represent important tools in basic UC research as they permit both to test hypotheses with regard to the cause and progression of CU as well as to explore the efficacy of therapeutic strategies.

The existing animal models are still limited because research concerning UC pathogenesis or therapeutics are generally performed several days after the induction of colitis. An experimental animal model that enables the investigation of early mucosal inflammation and a rapid screening of potential new therapeutics would provide new insights into the genesis of the disease and would facilitate the testing of new therapeutic strategies.

The aim of this graduate thesis was the establishment of an animal model that could serve as an experimental test system to study the early progression of UC pathogenesis and to evaluate novel therapeutic options.

In the short-time-damage-model established in this work, mucosal inflammation was induced by an *in situ* perfusion of a defined segment of the small intestine with the sulfhydryl blocker IA within a very short time. The histological examination revealed marked mucosal lesions caused by IA. The inflamed tissue was characterized by an increased mRNA-expression of inflammatory cytokines, and decreased mRNA-expression of the defence factor iAP and increased infiltration of CD68⁺ cells. The IA-induced inflammation was limited on the perfused segment, while segments proximal and distal to this site were not affected.

After successful establishment of the short-time-damage-model the effectiveness of two clinically relevant UC therapeutics, dexamethasone and Mutaflor, on the IA-induced mucosal inflammation could be verified. For both therapeutics tested the inflammation parameters were improved significantly compared to untreated animals.

The analysis of animals treated with Resormin, a naturally occurring clay mineral, showed for the first time the effectiveness of the silicate in the therapy of inflammatory bowel disease.

Treatment with IA followed by perfusion of Resormin significantly reduced the overall histological score, modified the expression of inflammatory cytokines and iAP, and slightly decreased the infiltration of CD68+ cells. The therapeutic effect of Resormin was even bigger compared to the currently used pharmaceuticals against UC.

In summary, the observations from animal colitis models and human UC regarding histological and molecular biological alterations could be verified in the short-time-damage-model. These data demonstrated the suitability of this model for the analysis of early processes in mucosal inflammation. Therapeutic effects could be investigated despite the short time period between induction of the inflammation and application of the therapeutic agent. The experimental design was reproducible and the effectiveness of potential therapeutics could be analysed within a few hours. At the same time the stress level of the laboratory animals was considerably reduced in this model compared to long term animal colitis models.

The molecular mechanisms by which Resormin exerted the beneficial effects in the short time model were analysed in the cell biology work package of this thesis. Stimulation of the human intestinal epithelial cells SW480 with a cocktail consisting of pro-inflammatory cytokines and the endotoxin LPS in presence of smectites significantly decreased MCP-1 expression. In differentiated Caco-2 cells, treatment with smectites induced an increase of transepithelial electric resistance (TEER). Furthermore, in differentiated Caco-2 cells stimulated with TNF α or macrophage like THP-1 cells the simultaneous coincubation with smectites was able to significantly recover TEER values. In addition, using vitality assays the smectites didn't mediate any toxic potential to the human intestinal epithelia cell lines SW480 and Caco-2. These data indicate that the therapeutic effect of the smectites *in vitro* and in the short-time-damage-model is due to the adhesion of pro-inflammatory cytokines and reactive metabolites. However, further analyses are needed to clarify the therapeutic potential of smectites at the molecular level.

9 Literaturverzeichnis

1. J. P. Lallès, *Intestinal alkaline phosphatase: Multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet*, *Nutr Rev* **68** (2010) , no. 6, 323-332.
2. T. T. Macdonald and G. Monteleone, *Immunity, inflammation, and allergy in the gut*, *Science* **307** (2005) , no. 5717, 1920-1925.
3. M. R. Neutra, E. Pringault and J. P. Kraehenbuhl, *Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses*, *Annu Rev Immunol* **14** (1996) , 275-300.
4. J. H. Niess, S. Brand, X. Gu, L. Landsman, S. Jung, B. A. McCormick, J. M. Vyas, M. Boes, H. L. Ploegh, J. G. Fox, D. R. Littman and H. C. Reinecker, *Cx3cr1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance*, *Science* **307** (2005) , no. 5707, 254-258.
5. M. H. Jang, M. N. Kweon, K. Iwatani, M. Yamamoto, K. Terahara, C. Sasakawa, T. Suzuki, T. Nochi, Y. Yokota, P. D. Rennert, T. Hiroi, H. Tamagawa, H. Iijima, J. Kunisawa, Y. Yuki and H. Kiyono, *Intestinal villous m cells: An antigen entry site in the mucosal epithelium*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** (2004) , no. 16, 6110-6115.
6. P. Brandtzaeg and F. E. Johansen, *Mucosal b cells: Phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties*, *Immunol Rev* **206** (2005) , 32-63.
7. D. A. Steeber and T. F. Tedder, *Adhesion molecule cascades direct lymphocyte recirculation and leukocyte migration during inflammation*, *Immunol Res* **22** (2000) , no. 2-3, 299-317.
8. P. Brandtzaeg, *Function of mucosa-associated lymphoid tissue in antibody formation*, *Immunol Invest* **39** (2010) , no. 4-5, 303-355.
9. S. R. Park, J. H. Lee and P. H. Kim, *Smad3 and smad4 mediate transforming growth factor-beta1-induced iga expression in murine b lymphocytes*, *Eur J Immunol* **31** (2001) , no. 6, 1706-1715.
10. M. F. Kagnoff, *Current concepts in mucosal immunity. Iii. Ontogeny and function of gamma delta t cells in the intestine*, *Am J Physiol* **274** (1998) , no. 3 Pt 1, G455-458.
11. S. Porcelli, M. B. Brenner and H. Band, *Biology of the human gamma delta t-cell receptor*, *Immunol Rev* **120** (1991) , 137-183.
12. B. Johansson-Lindbom, M. Svensson, O. Pabst, C. Palmqvist, G. Marquez, R. Förster and W. W. Agace, *Functional specialization of gut cd103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective t cell homing*, *J Exp Med* **202** (2005) , no. 8, 1063-1073.
13. O. Annacker, J. L. Coombes, V. Malmstrom, H. H. Uhlig, T. Bourne, B. Johansson-Lindbom, W. W. Agace, C. M. Parker and F. Powrie, *Essential role for cd103 in the t cell-mediated regulation of experimental colitis*, *J Exp Med* **202** (2005) , no. 8, 1051-1061.
14. T. R. Mosmann and R. L. Coffman, *Th1 and th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*, *Annu Rev Immunol* **7** (1989) , 145-173.
15. S. Romagnani, *Development of th 1- or th 2-dominated immune responses: What about the polarizing signals?*, *Int J Clin Lab Res* **26** (1996) , no. 2, 83-98.
16. H. Park, Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian and C. Dong, *A distinct lineage of cd4 t cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17*, *Nat Immunol* **6** (2005) , no. 11, 1133-1141.
17. S. Romagnani, *Biology of human th1 and th2 cells*, *J Clin Immunol* **15** (1995) , no. 3, 121-129.
18. T. A. Wynn, *T (h) -17: A giant step from t (h) 1 and t (h) 2*, *Nat Immunol* **6** (2005) , no. 11, 1069-1070.
19. M. G. Roncarolo, R. Bacchetta, C. Bordignon, S. Narula and M. K. Levings, *Type 1 t regulatory cells*, *Immunol Rev* **182** (2001) , 68-79.

20. H. Jonuleit, E. Schmitt, M. Stassen, A. Tuettenberg, J. Knop and A. H. Enk, *Identification and functional characterization of human cd4 (+) cd25 (+) t cells with regulatory properties isolated from peripheral blood*, J Exp Med **193** (2001) , no. 11, 1285-1294.
21. W. Ellmeier, L. Haust and R. Tschismarov, *Transcriptional control of cd4 and cd8 coreceptor expression during t cell development*, Cell Mol Life Sci **70** (2013) , no. 23, 4537-4553.
22. D. K. Podolsky, *Mucosal immunity and inflammation. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: The best offense is a good defense*, Am J Physiol **277** (1999) , no. 3 Pt 1, G495-499.
23. A. T. Blikslager, A. J. Moeser, J. L. Gookin, S. L. Jones and J. Odle, *Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa*, Physiol Rev **87** (2007) , no. 2, 545-564.
24. K. Kunzelmann and M. Mall, *Electrolyte transport in the mammalian colon: Mechanisms and implications for disease*, Physiol Rev **82** (2002) , no. 1, 245-289.
25. S. Bröer, *Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia*, Physiol Rev **88** (2008) , no. 1, 249-286.
26. R. P. Ferraris and J. Diamond, *Regulation of intestinal sugar transport*, Physiol Rev **77** (1997) , no. 1, 257-302.
27. A. S. Fanning, L. L. Mitic and J. M. Anderson, *Transmembrane proteins in the tight junction barrier*, J Am Soc Nephrol **10** (1999) , no. 6, 1337-1345.
28. S. N. Ukena, A. Singh, U. Dringenberg, R. Engelhardt, U. Seidler, W. Hansen, A. Bleich, D. Bruder, A. Franzke, G. Rogler, S. Suerbaum, J. Buer, F. Gunzer and A. M. Westendorf, *Probiotic escherichia coli nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity*, PLoS One **2** (2007) , no. 12, e1308.
29. K. Turksen and T. C. Troy, *Barriers built on claudins*, J Cell Sci **117** (2004) , no. Pt 12, 2435-2447.
30. D. C. Baumgart and S. R. Carding, *Inflammatory bowel disease: Cause and immunobiology*, Lancet **369** (2007) , no. 9573, 1627-1640.
31. M. BURNET, *Auto-immune disease. I. Modern immunological concepts*, Br Med J **2** (1959) , no. 5153, 645-650.
32. I. R. Cohen and D. B. Young, *Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus*, Immunol Today **12** (1991) , no. 4, 105-110.
33. S. Sakaguchi, *Naturally arising cd4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses*, Annu Rev Immunol **22** (2004) , 531-562.
34. N. M. Vaz, L. C. Maia, D. G. Hanson and J. M. Lynch, *Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen*, J Allergy Clin Immunol **60** (1977) , no. 2, 110-115.
35. B. Meresse, J. Ripoche, M. Heyman and N. Cerf-Bensussan, *Celiac disease: From oral tolerance to intestinal inflammation, autoimmunity and lymphomagenesis*, Mucosal Immunol **2** (2009) , no. 1, 8-23.
36. H. L. Weiner, A. P. da Cunha, F. Quintana and H. Wu, *Oral tolerance*, Immunol Rev **241** (2011) , no. 1, 241-259.
37. A. B. Price, *Overlap in the spectrum of non-specific inflammatory bowel disease--'colitis indeterminate'*, J Clin Pathol **31** (1978) , no. 6, 567-577.
38. A. Timmer, "Epidemiologie der ced," *Chronisch entzündliche darmerkrankungen handbuch für klinik und praxis*, A. J. Kroesen, B. Klump and J. C. Hoffman (Editors) , vol. 2, Thieme, Stuttgart, 2009, pp. 8-19.
39. A. Dignass, J. C. Preiss, D. E. Aust, F. Autschbach, A. Ballauff, G. Barretton, B. Bokemeyer, S. Fichtner-Feigl, S. Hagel, K. R. Herrlinger, G. Jantschek, A. Kroesen, W. Kruis, T. Kucharzik, J. Langhorst, M. Reinshagen, G. Rogler, D. Schleiermacher, C. Schmidt, S. Schreiber, H. Schulze, E. Stange, M. Zeitz, J. C. Hoffmann and A. Stallmach, *[updated german guideline on diagnosis and treatment of ulcerative colitis, 2011]*, Z Gastroenterol **49** (2011) , no. 9, 1276-1341.
40. J. C. Preiß, B. Bokemeyer, H. J. Buhr, A. Dignass, W. Häuser, F. Hartmann, K. R. Herrlinger, B. Kaltz, P. Kienle, W. Kruis, T. Kucharzik, J. Langhorst, S. Schreiber, B.

- Siegmund, A. Stallmach, E. F. Stange, J. Stein and J. C. Hoffmann, *[updated german clinical practice guideline on "diagnosis and treatment of crohn's disease" 2014]*, *Z Gastroenterol* **52** (2014) , no. 12, 1431-1484.
41. N. A. Molodecky, I. S. Soon, D. M. Rabi, W. A. Ghali, M. Ferris, G. Chernoff, E. I. Benchimol, R. Panaccione, S. Ghosh, H. W. Barkema and G. G. Kaplan, *Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review*, *Gastroenterology* **142** (2012) , no. 1, 46-54.e42; quiz e30.
 42. D. K. Podolsky, *Inflammatory bowel disease*, *N Engl J Med* **347** (2002) , no. 6, 417-429.
 43. M. Orholm, P. Munkholm, E. Langholz, O. H. Nielsen, T. I. Sørensen and V. Binder, *Familial occurrence of inflammatory bowel disease*, *N Engl J Med* **324** (1991) , no. 2, 84-88.
 44. J. Halfvarson, L. Bodin, C. Tysk, E. Lindberg and G. Järnerot, *Inflammatory bowel disease in a swedish twin cohort: A long-term follow-up of concordance and clinical characteristics*, *Gastroenterology* **124** (2003) , no. 7, 1767-1773.
 45. M. E. Spehlmann, A. Z. Begun, J. Burghardt, P. Lepage, A. Raedler and S. Schreiber, *Epidemiology of inflammatory bowel disease in a german twin cohort: Results of a nationwide study*, *Inflamm Bowel Dis* **14** (2008) , no. 7, 968-976.
 46. S. Schreiber, "Genetische ätiologie der ced," *Chronisch entzündliche darmerkrankungen handbuch für klinik und praxis*, A. J. Kroesen, B. Klump and J. C. Hoffmann (Editors) , vol. 2, Thieme2009, pp. 25-28.
 47. J. H. Cho, *The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease*, *Nat Rev Immunol* **8** (2008) , no. 6, 458-466.
 48. R. K. Weersma, H. M. van Dullemen, G. van der Steege, I. M. Nolte, J. H. Kleibeuker and G. Dijkstra, *Review article: Inflammatory bowel disease and genetics*, *Aliment Pharmacol Ther* **26 Suppl 2** (2007) , 57-65.
 49. T. Nunes, G. Fiorino, S. Danese and M. Sans, *Familial aggregation in inflammatory bowel disease: Is it genes or environment?*, *World J Gastroenterol* **17** (2011) , no. 22, 2715-2722.
 50. C. Schultz, F. M. Van Den Berg, F. W. Ten Kate, G. N. Tytgat and J. Dankert, *The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls*, *Gastroenterology* **117** (1999) , no. 5, 1089-1097.
 51. B. Kleessen, A. J. Kroesen, H. J. Buhr and M. Blaut, *Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls*, *Scand J Gastroenterol* **37** (2002) , no. 9, 1034-1041.
 52. C. O. Elson, R. B. Sartor, G. S. Tennyson and R. H. Riddell, *Experimental models of inflammatory bowel disease*, *Gastroenterology* **109** (1995) , no. 4, 1344-1367.
 53. B. Sadlack, H. Merz, H. Schorle, A. Schimpl, A. C. Feller and I. Horak, *Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene*, *Cell* **75** (1993) , no. 2, 253-261.
 54. R. K. Sellon, S. Tonkonogy, M. Schultz, L. A. Dieleman, W. Grenther, E. Balish, D. M. Rennick and R. B. Sartor, *Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice*, *Infect Immun* **66** (1998) , no. 11, 5224-5231.
 55. J. F. Colombel, M. Lémann, M. Cassagnou, Y. Bouhnik, B. Duclos, J. L. Dupas, B. Nottoghem and J. Y. Mary, *A controlled trial comparing ciprofloxacin with mesalazine for the treatment of active crohn's disease. Groupe d'etudes thérapeutiques des affections inflammatoires digestives (getaid)*, *Am J Gastroenterol* **94** (1999) , no. 3, 674-678.
 56. P. Gionchetti, F. Rizzello, A. Ferrieri, A. Venturi, C. Brignola, M. Ferretti, S. Peruzzo, M. Miglioli and M. Campieri, *Rifaximin in patients with moderate or severe ulcerative colitis refractory to steroid-treatment: A double-blind, placebo-controlled trial*, *Dig Dis Sci* **44** (1999) , no. 6, 1220-1221.
 57. W. Kruis, P. Fric, J. Pokrotnieks, M. Lukás, B. Fixa, M. Kascák, M. A. Kamm, J. Weismueller, C. Beglinger, M. Stolte, C. Wolff and J. Schulze, *Maintaining remission*

- of ulcerative colitis with the probiotic escherichia coli nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine*, Gut **53** (2004) , no. 11, 1617-1623.
58. W. Kruis, E. Schütz, P. Fric, B. Fixa, G. Judmaier and M. Stolte, *Double-blind comparison of an oral escherichia coli preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis*, Aliment Pharmacol Ther **11** (1997) , no. 5, 853-858.
 59. A. Venturi, P. Gionchetti, F. Rizzello, R. Johansson, E. Zucconi, P. Brigidi, D. Matteuzzi and M. Campieri, *Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: Preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis*, Aliment Pharmacol Ther **13** (1999) , no. 8, 1103-1108.
 60. B. J. Rembacken, A. M. Snelling, P. M. Hawkey, D. M. Chalmers and A. T. Axon, *Non-pathogenic escherichia coli versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: A randomised trial*, Lancet **354** (1999) , no. 9179, 635-639.
 61. R. B. Sartor, *Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: Antibiotics, probiotics, and prebiotics*, Gastroenterology **126** (2004) , no. 6, 1620-1633.
 62. D. P. Strachan, *Hay fever, hygiene, and household size*, BMJ **299** (1989) , no. 6710, 1259-1260.
 63. S. Timm, C. Svanes, C. Janson, T. Sigsgaard, A. Johannessen, T. Gislason, R. Jogi, E. Omenaas, B. Forsberg, K. Torén, M. Holm, L. Bråbäck and V. Schlünssen, *Place of upbringing in early childhood as related to inflammatory bowel diseases in adulthood: A population-based cohort study in northern europe*, Eur J Epidemiol **29** (2014) , no. 6, 429-437.
 64. B. A. Lashner and E. V. Loftus, *True or false? The hygiene hypothesis for crohn's disease*, Am J Gastroenterol **101** (2006) , no. 5, 1003-1004.
 65. K. Radon, D. Windstetter, A. L. Poluda, B. Mueller, E. von Mutius, S. Koletzko and C. A. u. K. z. T. C. A. D. a. A. C. S. Group, *Contact with farm animals in early life and juvenile inflammatory bowel disease: A case-control study*, Pediatrics **120** (2007) , no. 2, 354-361.
 66. A. E. Gent, M. D. Hellier, R. H. Grace, E. T. Swarbrick and D. Coggon, *Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy*, Lancet **343** (1994) , no. 8900, 766-767.
 67. E. V. Loftus and W. J. Sandborn, *Epidemiology of inflammatory bowel disease*, Gastroenterol Clin North Am **31** (2002) , no. 1, 1-20.
 68. B. M. Calkins, *A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease*, Dig Dis Sci **34** (1989) , no. 12, 1841-1854.
 69. T. Hisamatsu, N. Inoue, T. Yajima, M. Izumiya, H. Ichikawa and T. Hibi, *Psychological aspects of inflammatory bowel disease*, J Gastroenterol **42 Suppl 17** (2007) , 34-40.
 70. J. E. Mawdsley and D. S. Rampton, *The role of psychological stress in inflammatory bowel disease*, Neuroimmunomodulation **13** (2006) , no. 5-6, 327-336.
 71. G. MN, "Klinik der colitis ulcerosa," *Chronisch entzündliche darmerkrankungen handbuch für klinik und praxis*, K. AJ, K. B and H. JC (Editors) , Thieme, Stuttgart, 2009, pp. 82-85.
 72. R. D. Pullan, G. A. Thomas, M. Rhodes, R. G. Newcombe, G. T. Williams, A. Allen and J. Rhodes, *Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis*, Gut **35** (1994) , no. 3, 353-359.
 73. Q. Li, Q. Zhang, M. Wang, S. Zhao, J. Ma, N. Luo, N. Li, Y. Li, G. Xu and J. Li, *Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha disrupt epithelial barrier function by altering lipid composition in membrane microdomains of tight junction*, Clin Immunol **126** (2008) , no. 1, 67-80.
 74. A. M. Faria and H. L. Weiner, *Oral tolerance: Mechanisms and therapeutic applications*, Adv Immunol **73** (1999) , 153-264.
 75. H. L. Weiner, *Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting th3 regulatory cells*, Immunol Rev **182** (2001) , 207-214.
 76. M. C. Lebre, J. C. Antons, P. Kalinski, J. H. Schuitemaker, T. M. van Capel, M. L. Kapsenberg and E. C. De Jong, *Double-stranded rna-exposed human keratinocytes*

- promote th1 responses by inducing a type-1 polarized phenotype in dendritic cells: Role of keratinocyte-derived tumor necrosis factor alpha, type i interferons, and interleukin-18*, *J Invest Dermatol* **120** (2003) , no. 6, 990-997.
77. G. Rogler, K. Brand, D. Vogl, S. Page, R. Hofmeister, T. Andus, R. Knuechel, P. A. Baeuerle, J. Schölmerich and V. Gross, *Nuclear factor kappa b is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa*, *Gastroenterology* **115** (1998) , no. 2, 357-369.
 78. S. Akira and T. Kishimoto, *Nf-il6 and nf-kappa b in cytokine gene regulation*, *Adv Immunol* **65** (1997) , 1-46.
 79. M. M. Rahman and G. McFadden, *Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens*, *PLoS Pathog* **2** (2006) , no. 2, e4.
 80. Z. Chen, J. Hagler, V. J. Palombella, F. Melandri, D. Scherer, D. Ballard and T. Maniatis, *Signal-induced site-specific phosphorylation targets i kappa b alpha to the ubiquitin-proteasome pathway*, *Genes Dev* **9** (1995) , no. 13, 1586-1597.
 81. S. Beinke and S. C. Ley, *Functions of nf-kappab1 and nf-kappab2 in immune cell biology*, *Biochem J* **382** (2004) , no. Pt 2, 393-409.
 82. R. Atreya, J. Mudter, S. Finotto, J. Müllberg, T. Jostock, S. Wirtz, M. Schütz, B. Bartsch, M. Holtmann, C. Becker, D. Strand, J. Czaja, J. F. Schlaak, H. A. Lehr, F. Autschbach, G. Schürmann, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, H. Ito, T. Kishimoto, P. R. Galle, S. Rose-John and M. F. Neurath, *Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses t-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: Evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo*, *Nat Med* **6** (2000) , no. 5, 583-588.
 83. H. van Dullemen, J. Meenan, A. Stronkhorst, G. N. Tytgat and S. J. van Deventer, *Mediators of mucosal inflammation: Implications for therapy*, *Scand J Gastroenterol Suppl* **223** (1997) , 92-98.
 84. J. Mudter, S. Wirtz, P. R. Galle and M. F. Neurath, *A new model of chronic colitis in scid mice induced by adoptive transfer of cd62l+ cd4+ t cells: Insights into the regulatory role of interleukin-6 on apoptosis*, *Pathobiology* **70** (2002) , no. 3, 170-176.
 85. G. Kaplanski, V. Marin, F. Montero-Julian, A. Mantovani and C. Farnarier, *Il-6: A regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation*, *Trends Immunol* **24** (2003) , no. 1, 25-29.
 86. J. Mudter and M. F. Neurath, *Il-6 signaling in inflammatory bowel disease: Pathophysiological role and clinical relevance*, *Inflamm Bowel Dis* **13** (2007) , no. 8, 1016-1023.
 87. M. Veldhoen and B. Stockinger, *Tgfbeta1, a "jack of all trades": The link with pro-inflammatory il-17-producing t cells*, *Trends Immunol* **27** (2006) , no. 8, 358-361.
 88. D. F. Fiorentino, A. Zlotnik, P. Vieira, T. R. Mosmann, M. Howard, K. W. Moore and A. O'Garra, *Il-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by th1 cells*, *J Immunol* **146** (1991) , no. 10, 3444-3451.
 89. K. Asadullah, W. Sterry and H. D. Volk, *Interleukin-10 therapy--review of a new approach*, *Pharmacol Rev* **55** (2003) , no. 2, 241-269.
 90. J. A. DiVietro, M. J. Smith, B. R. Smith, L. Petruzzelli, R. S. Larson and M. B. Lawrence, *Immobilized il-8 triggers progressive activation of neutrophils rolling in vitro on p-selectin and intercellular adhesion molecule-1*, *J Immunol* **167** (2001) , no. 7, 4017-4025.
 91. E. J. Williams, S. Haque, C. Banks, P. Johnson, P. Sarsfield and N. Sheron, *Distribution of the interleukin-8 receptors, cxcr1 and cxcr2, in inflamed gut tissue*, *J Pathol* **192** (2000) , no. 4, 533-539.
 92. M. L. Rodríguez-Perálvarez, V. García-Sánchez, C. M. Villar-Pastor, R. González, E. Iglesias-Flores, J. Muntane and F. Gómez-Camacho, *Role of serum cytokine profile in ulcerative colitis assessment*, *Inflamm Bowel Dis* **18** (2012) , no. 10, 1864-1871.
 93. T. J. Schall and K. B. Bacon, *Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation*, *Curr Opin Immunol* **6** (1994) , no. 6, 865-873.

94. J. Puleston, M. Cooper, S. Murch, K. Bid, S. Makh, P. Ashwood, A. H. Bingham, H. Green, P. Moss, A. Dhillon, R. Morris, S. Strobel, R. Gelinas, R. E. Pounder and A. Platt, *A distinct subset of chemokines dominates the mucosal chemokine response in inflammatory bowel disease*, *Aliment Pharmacol Ther* **21** (2005) , no. 2, 109-120.
95. M. Uguccioni, P. Gionchetti, D. F. Robbiani, F. Rizzello, S. Peruzzo, M. Campieri and M. Baggiolini, *Increased expression of ip-10, il-8, mcp-1, and mcp-3 in ulcerative colitis*, *Am J Pathol* **155** (1999) , no. 2, 331-336.
96. C. Banks, A. Bateman, R. Payne, P. Johnson and N. Sheron, *Chemokine expression in ibd. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and crohn's disease*, *J Pathol* **199** (2003) , no. 1, 28-35.
97. W. I. Khan, Y. Motomura, H. Wang, R. T. El-Sharkawy, E. F. Verdu, M. Verma-Gandhu, B. J. Rollins and S. M. Collins, *Critical role of mcp-1 in the pathogenesis of experimental colitis in the context of immune and enterochromaffin cells*, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291** (2006) , no. 5, G803-811.
98. L. A. Zenewicz, A. Antov and R. A. Flavell, *Cd4 t-cell differentiation and inflammatory bowel disease*, *Trends Mol Med* **15** (2009) , no. 5, 199-207.
99. A. M. Globig, N. Hennecke, B. Martin, M. Seidl, G. Ruf, P. Hasselblatt, R. Thimme and B. Bengsch, *Comprehensive intestinal t helper cell profiling reveals specific accumulation of ifn- γ +il-17+coproducting cd4+ t cells in active inflammatory bowel disease*, *Inflamm Bowel Dis* **20** (2014) , no. 12, 2321-2329.
100. W. Jiang, J. Su, X. Zhang, X. Cheng, J. Zhou, R. Shi and H. Zhang, *Elevated levels of th17 cells and th17-related cytokines are associated with disease activity in patients with inflammatory bowel disease*, *Inflamm Res* **63** (2014) , no. 11, 943-950.
101. G. Napolitani, E. V. Acosta-Rodriguez, A. Lanzavecchia and F. Sallusto, *Prostaglandin e2 enhances th17 responses via modulation of il-17 and ifn-gamma production by memory cd4+ t cells*, *Eur J Immunol* **39** (2009) , no. 5, 1301-1312.
102. J. M. Curtsinger, J. O. Valenzuela, P. Agarwal, D. Lins and M. F. Mescher, *Type i ifns provide a third signal to cd8 t cells to stimulate clonal expansion and differentiation*, *J Immunol* **174** (2005) , no. 8, 4465-4469.
103. J. Lu, R. L. Giuntoli, R. Omiya, H. Kobayashi, R. Kennedy and E. Celis, *Interleukin 15 promotes antigen-independent in vitro expansion and long-term survival of antitumor cytotoxic t lymphocytes*, *Clin Cancer Res* **8** (2002) , no. 12, 3877-3884.
104. M. Briskin, D. Winsor-Hines, A. Shyjan, N. Cochran, S. Bloom, J. Wilson, L. M. McEvoy, E. C. Butcher, N. Kassam, C. R. Mackay, W. Newman and D. J. Ringler, *Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue*, *Am J Pathol* **151** (1997) , no. 1, 97-110.
105. J. Panés and D. N. Granger, *Leukocyte-endothelial cell interactions: Molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease*, *Gastroenterology* **114** (1998) , no. 5, 1066-1090.
106. G. Monteleone and F. Caprioli, *T-cell-directed therapies in inflammatory bowel diseases*, *Clin Sci (Lond)* **118** (2010) , no. 12, 707-715.
107. J. Mudter and M. F. Neurath, *Apoptosis of t cells and the control of inflammatory bowel disease: Therapeutic implications*, *Gut* **56** (2007) , no. 2, 293-303.
108. S. H. Kaufmann, *Gamma/delta and other unconventional t lymphocytes: What do they see and what do they do?*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** (1996) , no. 6, 2272-2279.
109. K. Inagaki-Ohara, T. Chinen, G. Matsuzaki, A. Sasaki, Y. Sakamoto, K. Hiromatsu, F. Nakamura-Uchiyama, Y. Nawa and A. Yoshimura, *Mucosal t cells bearing tcr γ ammadelta play a protective role in intestinal inflammation*, *J Immunol* **173** (2004) , no. 2, 1390-1398.
110. W. L. Havran, *A role for epithelial gammadelta t cells in tissue repair*, *Immunol Res* **21** (2000) , no. 2-3, 63-69.
111. W. K. Born and R. L. O'Brien, *The healing touch of epidermal t cells*, *Nat Med* **8** (2002) , no. 6, 560-561.

112. I. J. Fuss, F. Heller, M. Boirivant, F. Leon, M. Yoshida, S. Fichtner-Feigl, Z. Yang, M. Exley, A. Kitani, R. S. Blumberg, P. Mannon and W. Strober, *Nonclassical cd1d-restricted nk t cells that produce il-13 characterize an atypical th2 response in ulcerative colitis*, J Clin Invest **113** (2004) , no. 10, 1490-1497.
113. A. W. Steel, C. M. Mela, J. O. Lindsay, B. G. Gazzard and M. R. Goodier, *Increased proportion of cd16 (+) nk cells in the colonic lamina propria of inflammatory bowel disease patients, but not after azathioprine treatment*, Aliment Pharmacol Ther **33** (2011) , no. 1, 115-126.
114. T. Kucharzik, S. V. Walsh, J. Chen, C. A. Parkos and A. Nusrat, *Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins*, Am J Pathol **159** (2001) , no. 6, 2001-2009.
115. A. Nusrat, C. A. Parkos, T. W. Liang, D. K. Carnes and J. L. Madara, *Neutrophil migration across model intestinal epithelia: Monolayer disruption and subsequent events in epithelial repair*, Gastroenterology **113** (1997) , no. 5, 1489-1500.
116. T. Kasama, R. M. Strieter, T. J. Standiford, M. D. Burdick and S. L. Kunkel, *Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha*, J Exp Med **178** (1993) , no. 1, 63-72.
117. J. C. Brazil, N. A. Louis and C. A. Parkos, *The role of polymorphonuclear leukocyte trafficking in the perpetuation of inflammation during inflammatory bowel disease*, Inflamm Bowel Dis **19** (2013) , no. 7, 1556-1565.
118. M. F. Neurath and G. Schürmann, *[immunopathogenesis of inflammatory bowel diseases]*, Chirurg **71** (2000) , no. 1, 30-40.
119. F. S. Lehmann, *[pathophysiology of inflammatory bowel disease]*, Ther Umsch **60** (2003) , no. 3, 127-132.
120. L. Rovedatti, T. Kudo, P. Biancheri, M. Sarra, C. H. Knowles, D. S. Rampton, G. R. Corazza, G. Monteleone, A. Di Sabatino and T. T. Macdonald, *Differential regulation of interleukin 17 and interferon gamma production in inflammatory bowel disease*, Gut **58** (2009) , no. 12, 1629-1636.
121. R. A. Hodin, S. M. Chamberlain and S. Meng, *Pattern of rat intestinal brush-border enzyme gene expression changes with epithelial growth state*, Am J Physiol **269** (1995) , no. 2 Pt 1, C385-391.
122. A. Tuin, K. Poelstra, A. de Jager-Krikken, L. Bok, W. Raaben, M. P. Velders and G. Dijkstra, *Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats*, Gut **58** (2009) , no. 3, 379-387.
123. K. Molnár, A. Vannay, B. Szebeni, N. F. Bánki, E. Sziksz, A. Cseh, H. Györffy, P. L. Lakatos, M. Papp, A. Arató and G. Veres, *Intestinal alkaline phosphatase in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease*, World J Gastroenterol **18** (2012) , no. 25, 3254-3259.
124. .
125. H. Bentala, W. R. Verweij, A. Huizinga-Van der Vlag, A. M. van Loenen-Weemaes, D. K. Meijer and K. Poelstra, *Removal of phosphate from lipid a as a strategy to detoxify lipopolysaccharide*, Shock **18** (2002) , no. 6, 561-566.
126. K. Poelstra, W. W. Bakker, P. A. Klok, J. A. Kamps, M. J. Hardonk and D. K. Meijer, *Dephosphorylation of endotoxin by alkaline phosphatase in vivo*, Am J Pathol **151** (1997) , no. 4, 1163-1169.
127. J. M. Bates, J. Akerlund, E. Mittge and K. Guillemin, *Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota*, Cell Host Microbe **2** (2007) , no. 6, 371-382.
128. S. Ramasamy, D. D. Nguyen, M. A. Eston, S. N. Alam, A. K. Moss, F. Ebrahimi, B. Biswas, G. Mostafa, K. T. Chen, K. Kaliannan, H. Yamine, S. Narisawa, J. L. Millán, H. S. Warren, E. L. Hohmann, E. Mizoguchi, H. C. Reinecker, A. K. Bhan, S. B. Snapper, M. S. Malo and R. A. Hodin, *Intestinal alkaline phosphatase has beneficial effects in mouse models of chronic colitis*, Inflamm Bowel Dis **17** (2011) , no. 2, 532-542.

129. M. Lukas, P. Drastich, M. Konecny, P. Gionchetti, O. Urban, F. Cantoni, M. Bortlik, D. Duricova and M. Bulitta, *Exogenous alkaline phosphatase for the treatment of patients with moderate to severe ulcerative colitis*, *Inflamm Bowel Dis* **16** (2010) , no. 7, 1180-1186.
130. R. Karagozian and R. Burakoff, *The role of mesalamine in the treatment of ulcerative colitis*, *Ther Clin Risk Manag* **3** (2007) , no. 5, 893-903.
131. D. K. Podolsky, *The current future understanding of inflammatory bowel disease*, *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **16** (2002) , no. 6, 933-943.
132. R. G., *Chronisch entzündliche darmerkrankungen handbuch für klinik und praxis*, vol. 2. Auflage 2009.
133. H. JC, *Grundprinzipien der ced-behandlung.*, vol. 2. Auflage, Thieme, Stuttgart, 2009.
134. M. Pierik, P. Rutgeerts, R. Vlietinck and S. Vermeire, *Pharmacogenetics in inflammatory bowel disease*, *World J Gastroenterol* **12** (2006) , no. 23, 3657-3667.
135. G. R. Lichtenstein, M. T. Abreu, R. Cohen, W. Tremaine and A. G. Association, *American gastroenterological association institute technical review on corticosteroids, immunomodulators, and infliximab in inflammatory bowel disease*, *Gastroenterology* **130** (2006) , no. 3, 940-987.
136. J. Schölmerich, *Review article: Systemic and topical steroids in inflammatory bowel disease*, *Aliment Pharmacol Ther* **20 Suppl 4** (2004) , 66-74.
137. G. Bianchi Porro, A. Cassinotti, E. Ferrara, G. Maconi and S. Ardizzone, *Review article: The management of steroid dependency in ulcerative colitis*, *Aliment Pharmacol Ther* **26** (2007) , no. 6, 779-794.
138. W. A. Faubion, E. V. Loftus, W. S. Harmsen, A. R. Zinsmeister and W. J. Sandborn, *The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: A population-based study*, *Gastroenterology* **121** (2001) , no. 2, 255-260.
139. K. A. Papadakis and S. R. Targan, *Tumor necrosis factor: Biology and therapeutic inhibitors*, *Gastroenterology* **119** (2000) , no. 4, 1148-1157.
140. B. J. Scallon, M. A. Moore, H. Trinh, D. M. Knight and J. Ghraieb, *Chimeric anti-tnf-alpha monoclonal antibody ca2 binds recombinant transmembrane tnfr-alpha and activates immune effector functions*, *Cytokine* **7** (1995) , no. 3, 251-259.
141. T. ten Hove, C. van Montfrans, M. P. Peppelenbosch and S. J. van Deventer, *Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria t lymphocytes in crohn's disease*, *Gut* **50** (2002) , no. 2, 206-211.
142. M. Clark, J. F. Colombel, B. C. Feagan, R. N. Fedorak, S. B. Hanauer, M. A. Kamm, L. Mayer, C. Regueiro, P. Rutgeerts, W. J. Sandborn, B. E. Sands, S. Schreiber, S. Targan, S. Travis and S. Vermeire, *American gastroenterological association consensus development conference on the use of biologics in the treatment of inflammatory bowel disease, june 21-23, 2006*, *Gastroenterology* **133** (2007) , no. 1, 312-339.
143. C. Vanderpool, F. Yan and D. B. Polk, *Mechanisms of probiotic action: Implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases*, *Inflamm Bowel Dis* **14** (2008) , no. 11, 1585-1596.
144. S. C. Ng, A. L. Hart, M. A. Kamm, A. J. Stagg and S. C. Knight, *Mechanisms of action of probiotics: Recent advances*, *Inflamm Bowel Dis* **15** (2009) , no. 2, 300-310.
145. J. M. Schröder, *Epithelial antimicrobial peptides: Innate local host response elements*, *Cell Mol Life Sci* **56** (1999) , no. 1-2, 32-46.
146. K. M. Huttner and C. L. Bevins, *Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defense*, *Pediatr Res* **45** (1999) , no. 6, 785-794.
147. M. Ramasundara, S. T. Leach, D. A. Lemberg and A. S. Day, *Defensins and inflammation: The role of defensins in inflammatory bowel disease*, *J Gastroenterol Hepatol* **24** (2009) , no. 2, 202-208.
148. R. Mennigen and M. Bruewer, *Effect of probiotics on intestinal barrier function*, *Ann N Y Acad Sci* **1165** (2009) , 183-189.
149. A. NISSLE, *[mutaflor and its medical significance]*, *Z Klin Med* **2** (1951) , no. 3-4, 68.

150. L. Grozdanov, C. Raasch, J. Schulze, U. Sonnenborn, G. Gottschalk, J. Hacker and U. Dobrindt, *Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic escherichia coli strain nissle 1917*, J Bacteriol **186** (2004) , no. 16, 5432-5441.
151. C. Grosse, J. Scherer, D. Koch, M. Otto, N. Taudte and G. Grass, *A new ferrous iron-uptake transporter, efeu (ycdN) , from escherichia coli*, Mol Microbiol **62** (2006) , no. 1, 120-131.
152. M. Schultz, *Clinical use of e. Coli nissle 1917 in inflammatory bowel disease*, Inflamm Bowel Dis **14** (2008) , no. 7, 1012-1018.
153. M. L. Cross, A. Ganner, D. Teilab and L. M. Fray, *Patterns of cytokine induction by gram-positive and gram-negative probiotic bacteria*, FEMS Immunol Med Microbiol **42** (2004) , no. 2, 173-180.
154. S. N. Ukena, A. M. Westendorf, W. Hansen, M. Rohde, R. Geffers, S. Coldewey, S. Suerbaum, J. Buer and F. Gunzer, *The host response to the probiotic escherichia coli strain nissle 1917: Specific up-regulation of the proinflammatory chemokine mcp-1*, BMC Med Genet **6** (2005) , 43.
155. N. Kamada, N. Inoue, T. Hisamatsu, S. Okamoto, K. Matsuoka, T. Sato, H. Chinen, K. S. Hong, T. Yamada, Y. Suzuki, T. Suzuki, N. Watanabe, K. Tsuchimoto and T. Hibi, *Nonpathogenic escherichia coli strain nissle1917 prevents murine acute and chronic colitis*, Inflamm Bowel Dis **11** (2005) , no. 5, 455-463.
156. A. A. Zyrek, C. Cichon, S. Helms, C. Enders, U. Sonnenborn and M. A. Schmidt, *Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of escherichia coli nissle 1917 involve zo-2 and pkczeta redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair*, Cell Microbiol **9** (2007) , no. 3, 804-816.
157. M. Möndel, B. O. Schroeder, K. Zimmermann, H. Huber, S. Nuding, J. Beisner, K. Fellermann, E. F. Stange and J. Wehkamp, *Probiotic e. Coli treatment mediates antimicrobial human beta-defensin synthesis and fecal excretion in humans*, Mucosal Immunol **2** (2009) , no. 2, 166-172.
158. A. Altenhoefer, S. Oswald, U. Sonnenborn, C. Enders, J. Schulze, J. Hacker and T. A. Oelschlaeger, *The probiotic escherichia coli strain nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens*, FEMS Immunol Med Microbiol **40** (2004) , no. 3, 223-229.
159. M. Schultz, S. Watzl, T. A. Oelschlaeger, H. C. Rath, C. Göttl, N. Lehn, J. Schölmerich and H. J. Linde, *Green fluorescent protein for detection of the probiotic microorganism escherichia coli strain nissle 1917 (ecn) in vivo*, J Microbiol Methods **61** (2005) , no. 3, 389-398.
160. M. Prilasnig, C. Wenisch, F. Daxboeck and G. Feierl, *Are probiotics detectable in human feces after oral uptake by healthy volunteers?*, Wien Klin Wochenschr **119** (2007) , no. 15-16, 456-462.
161. M. Schultz, U. G. Strauch, H. J. Linde, S. Watzl, F. Obermeier, C. Göttl, N. Dunger, N. Grunwald, J. Schölmerich and H. C. Rath, *Preventive effects of escherichia coli strain nissle 1917 on acute and chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis*, Clin Diagn Lab Immunol **11** (2004) , no. 2, 372-378.
162. A. Grabig, D. Paclik, C. Guzy, A. Dankof, D. C. Baumgart, J. Erckenbrecht, B. Raupach, U. Sonnenborn, J. Eckert, R. R. Schumann, B. Wiedenmann, A. U. Dignass and A. Sturm, *Escherichia coli strain nissle 1917 ameliorates experimental colitis via toll-like receptor 2- and toll-like receptor 4-dependent pathways*, Infect Immun **74** (2006) , no. 7, 4075-4082.
163. I. Okayasu, M. Yamada, T. Mikami, T. Yoshida, J. Kanno and T. Ohkusa, *Dysplasia and carcinoma development in a repeated dextran sulfate sodium-induced colitis model*, J Gastroenterol Hepatol **17** (2002) , no. 10, 1078-1083.
164. S. Kitajima, S. Takuma and M. Morimoto, *Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights*, Exp Anim **49** (2000) , no. 1, 9-15.
165. L. Stevceva, P. Pavli, A. J. Husband and W. F. Doe, *The inflammatory infiltrate in the acute stage of the dextran sulphate sodium induced colitis: B cell response differs depending on the percentage of dss used to induce it*, BMC Clin Pathol **1** (2001) , no. 1, 3.

166. S. Kitajima, S. Takuma and M. Morimoto, *Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium*, Exp Anim **48** (1999) , no. 3, 137-143.
167. H. S. Cooper, S. N. Murthy, R. S. Shah and D. J. Sedergran, *Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis*, Lab Invest **69** (1993) , no. 2, 238-249.
168. J. Ni, S. F. Chen and D. Hollander, *Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes*, Gut **39** (1996) , no. 2, 234-241.
169. G. P. Morris, P. L. Beck, M. S. Herridge, W. T. Depew, M. R. Szewczuk and J. L. Wallace, *Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon*, Gastroenterology **96** (1989) , no. 3, 795-803.
170. M. F. Neurath, I. Fuss, B. L. Kelsall, E. Stüber and W. Strober, *Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice*, J Exp Med **182** (1995) , no. 5, 1281-1290.
171. M. I. Torres, M. García-Martin, M. I. Fernández, N. Nieto, A. Gil and A. Ríos, *Experimental colitis induced by trinitrobenzenesulfonic acid: An ultrastructural and histochemical study*, Dig Dis Sci **44** (1999) , no. 12, 2523-2529.
172. M. F. Neurath and K. H. Meyer zum Büschenfelde, *Protective and pathogenic roles of cytokines in inflammatory bowel diseases*, J Investig Med **44** (1996) , no. 9, 516-521.
173. H. Satoh, F. Sato, K. Takami and S. Szabo, *New ulcerative colitis model induced by sulfhydryl blockers in rats and the effects of antiinflammatory drugs on the colitis*, Jpn J Pharmacol **73** (1997) , no. 4, 299-309.
174. D. Rachmilewitz, F. Karmeli and E. Okon, *Sulfhydryl blocker-induced rat colonic inflammation is ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase*, Gastroenterology **109** (1995) , no. 1, 98-106.
175. O. Shibolet, F. Karmeli, R. Eliakim, E. Swennen, P. Brigidi, P. Gionchetti, M. Campieri, S. Morgenstern and D. Rachmilewitz, *Variable response to probiotics in two models of experimental colitis in rats*, Inflamm Bowel Dis **8** (2002) , no. 6, 399-406.
176. G. Tolstanova, T. Khomenko, X. Deng, L. Chen, A. Tarnawski, A. Ahluwalia, S. Szabo and Z. Sandor, *Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor (vegf) antibody reduces severity of experimental ulcerative colitis in rats: Direct evidence for the pathogenic role of vegf*, J Pharmacol Exp Ther **328** (2009) , no. 3, 749-757.
177. C. Grosse-Siestrup, J. Pfeffer, V. Unger, S. Nagel, C. Witt, A. Fischer and D. A. Groneberg, *Isolated hemoperfused slaughterhouse livers as a valid model to study hepatotoxicity*, Toxicol Pathol **30** (2002) , no. 6, 749-754.
178. C. Grosse-Siestrup, V. Unger, M. Meissler, S. Nagel, A. Wussow, C. Peiser, A. Fischer, R. Schmitt and D. A. Groneberg, *Hemoperfused isolated porcine slaughterhouse kidneys as a valid model for pharmacological studies*, J Pharm Sci **92** (2003) , no. 6, 1147-1154.
179. H. Yokoyama, T. Horie and S. Awazu, *Naproxen-induced oxidative stress in the isolated perfused rat liver*, Chem Biol Interact **160** (2006) , no. 2, 150-158.
180. S. E. Kong, L. R. Blennerhassett, K. A. Heel, R. D. McCauley and J. C. Hall, *Ischaemia-reperfusion injury to the intestine*, Aust N Z J Surg **68** (1998) , no. 8, 554-561.
181. C. Fondevila, X. D. Shen, S. Tsuchiyashi, K. Yamashita, E. Csizmadia, C. Lassman, R. W. Busuttil, J. W. Kupiec-Weglinski and F. H. Bach, *Biliverdin therapy protects rat livers from ischemia and reperfusion injury*, Hepatology **40** (2004) , no. 6, 1333-1341.
182. J. L. Arreola, M. H. Vargas, P. Segura, J. Chávez, B. Sommer, V. Carvajal and L. M. Montañó, *Possible role of substance p in the ischemia-reperfusion injury in the isolated rabbit lung*, Transplantation **78** (2004) , no. 2, 296-299.
183. T. H. WILSON and G. WISEMAN, *The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface*, J Physiol **123** (1954) , no. 1, 116-125.

184. P. Srirangam and S. J. Vidya, *Modulation of the p-glycoprotein-mediated intestinal secretion of glibenclamide: In vitro and in vivo assessments*, J Young Pharm **2** (2010) , no. 4, 379-383.
185. M. Y. Park, H. J. Kwon and M. K. Sung, *Intestinal absorption of aloin, aloe-emodin, and aloesin; a comparative study using two in vitro absorption models*, Nutr Res Pract **3** (2009) , no. 1, 9-14.
186. S. Higuchi, R. Wu, M. Zhou, C. P. Marini, T. S. Ravikumar and P. Wang, *Gut hyperpermeability after ischemia and reperfusion: Attenuation with adrenomedullin and its binding protein treatment*, Int J Clin Exp Pathol **1** (2008) , no. 5, 409-418.
187. H. Kavin, N. W. Levin and M. M. Stanley, *Isolated perfused rat small bowel--technic, studies of viability, glucose absorption*, J Appl Physiol **22** (1967) , no. 3, 604-611.
188. F. U. Sack, R. Dollner, B. Reidenbach, A. Schledt, S. Taylor, M. M. Gebhard and S. Hagl, *Extracorporeal circulation induced microvascular perfusion injury of the small bowel*, Eur Surg Res **34** (2002) , no. 6, 418-424.
189. S. Tamura, A. Ohike, Y. Tokunaga, R. Ibuki, G. L. Amidon, H. Sezaki and S. Yamashita, *Effect of experimental acute renal and hepatic failure on absorption of tacrolimus in rat small intestine*, Drug Metab Pharmacokinet **19** (2004) , no. 3, 190-197.
190. I. Lautenschläger, H. Dombrowsky, I. Frerichs, S. C. Kuchenbecker, S. Bade, H. Schultz, P. Zabel, J. Scholz, N. Weiler and S. Uhlig, *A model of the isolated perfused rat small intestine*, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **298** (2010) , no. 2, G304-313.
191. H. Burgmann, H. Reckendorfer, M. Sperlich and P. G. Spieckermann, *Comparison of bretsneider's-htk and euro-collins solution using an in vitro small bowel perfusion model*, Transplant Proc **28** (1996) , no. 5, 2636.
192. F. H. Mourad, K. A. Barada, N. A. Bou Rached, C. I. Khoury, N. E. Saadé and C. F. Nassar, *Inhibitory effect of experimental colitis on fluid absorption in rat jejunum: Role of the enteric nervous system, vip, and nitric oxide*, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **290** (2006) , no. 2, G262-268.
193. K. Ewe, *[resorption and secretion of calcium in the human jejunum]*, Klin Wochenschr **46** (1968) , no. 12, 661-666.
194. P. Ireland and J. S. Fordtran, *Effect of dietary calcium and age on jejunal calcium absorption in humans studied by intestinal perfusion*, J Clin Invest **52** (1973) , no. 11, 2672-2681.
195. N. Petri, C. Tannergren, B. Holst, F. A. Mellon, Y. Bao, G. W. Plumb, J. Bacon, K. A. O'Leary, P. A. Kroon, L. Knutson, P. Forsell, T. Eriksson, H. Lennernas and G. Williamson, *Absorption/metabolism of sulforaphane and quercetin, and regulation of phase ii enzymes, in human jejunum in vivo*, Drug Metab Dispos **31** (2003) , no. 6, 805-813.
196. H. Szajewska, P. Dziechciarz and J. Mrukowicz, *Meta-analysis: Smectite in the treatment of acute infectious diarrhoea in children*, Aliment Pharmacol Ther **23** (2006) , no. 2, 217-227.
197. C. Dupont, J. L. Foo, P. Garnier, N. Moore, H. Mathiex-Fortunet, E. Salazar-Lindo and P. a. M. D. S. Groups, *Oral diosmectite reduces stool output and diarrhea duration in children with acute watery diarrhea*, Clin Gastroenterol Hepatol **7** (2009) , no. 4, 456-462.
198. Q. M. Mujawar, R. Naganoor, M. D. Ali, N. Malagi and A. N. Thobbi, *Efficacy of dioctahedral smectite in acute watery diarrhea in indian children: A randomized clinical trial*, J Trop Pediatr **58** (2012) , no. 1, 63-67.
199. F. Khediri, A. I. Mrad, M. Azzouz, H. Doughi, T. Najjar, H. Mathiex-Fortunet, P. Garnier and A. Cortot, *Efficacy of diosmectite (smecta) in the treatment of acute watery diarrhoea in adults: A multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel group study*, Gastroenterol Res Pract **2011** (2011) , 783196.
200. A. Guarino, S. Ashkenazi, D. Gendrel, A. L. Vecchio, R. Shamir and H. Szajewska, *European society for paediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition/european society for paediatric infectious diseases evidence-based guidelines for the*

- management of acute gastroenteritis in children in europe: Update 2014*, J Pediatr Gastroenterol Nutr (2014) .
201. J. B. Gouyon, V. Boggio, M. Fantino, I. Gillot, B. Schatz and A. Vallin, *Smectite reduces gastroesophageal reflux in newborn infants*, Dev Pharmacol Ther **13** (1989) , no. 1, 46-50.
 202. K. R. Gardiner, N. H. Anderson, M. D. McCaigue, P. J. Erwin, M. I. Halliday and B. J. Rowlands, *Adsorbents as antiendotoxin agents in experimental colitis*, Gut **34** (1993) , no. 1, 51-55.
 203. R. González, F. S. de Medina, O. Martínez-Augustin, A. Nieto, J. Gálvez, S. Risco and A. Zarzuelo, *Anti-inflammatory effect of diosmectite in hapten-induced colitis in the rat*, Br J Pharmacol **141** (2004) , no. 6, 951-960.
 204. L. Mahraoui, M. Heyman, O. Plique, M. T. Droy-Lefaix and J. F. Desjeux, *Apical effect of diosmectite on damage to the intestinal barrier induced by basal tumour necrosis factor-alpha*, Gut **40** (1997) , no. 3, 339-343.
 205. S. Kaufhold and R. Dohrmann, *Detachment of colloidal particles from bentonites in water*, Applied Clay Science **39** (2008) , no. 1 -2, 50-59.
 206. K. m. W.-u. Umweltlabor, "Adsorptionsverhalten einer tonsuspension gegenüber ammoniumchlorid," 2009.
 207. a. AG, "Studie zum bindungsverhalten verschiedener mykotoxine auf friedländer benotonit mehl als mykotoxinadsorber," 2009.
 208. E. Grasset, J. Bernabeu and M. Pinto, *Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line caco-2: Effect of secretagogues*, Am J Physiol **248** (1985) , no. 5 Pt 1, C410-418.
 209. I. J. Hidalgo, T. J. Raub and R. T. Borchardt, *Characterization of the human colon carcinoma cell line (caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability*, Gastroenterology **96** (1989) , no. 3, 736-749.
 210. J. Van De Walle, A. Hendrickx, B. Romier, Y. Larondelle and Y. J. Schneider, *Inflammatory parameters in caco-2 cells: Effect of stimuli nature, concentration, combination and cell differentiation*, Toxicol In Vitro **24** (2010) , no. 5, 1441-1449.
 211. D. R. Clayburgh, L. Shen and J. R. Turner, *A porous defense: The leaky epithelial barrier in intestinal disease*, Lab Invest **84** (2004) , no. 3, 282-291.
 212. K. Welcker, A. Martin, P. Kölle, M. Siebeck and M. Gross, *Increased intestinal permeability in patients with inflammatory bowel disease*, Eur J Med Res **9** (2004) , no. 10, 456-460.
 213. R. T. Jenkins, J. K. Ramage, D. B. Jones, S. M. Collins, R. L. Goodacre and R. H. Hunt, *Small bowel and colonic permeability to 51cr-edta in patients with active inflammatory bowel disease*, Clin Invest Med **11** (1988) , no. 2, 151-155.
 214. J. M. Mullin and K. V. Snock, *Effect of tumor necrosis factor on epithelial tight junctions and transepithelial permeability*, Cancer Res **50** (1990) , no. 7, 2172-2176.
 215. H. Satsu, Y. Ishimoto, T. Nakano, T. Mochizuki, T. Iwanaga and M. Shimizu, *Induction by activated macrophage-like thp-1 cells of apoptotic and necrotic cell death in intestinal epithelial caco-2 monolayers via tumor necrosis factor-alpha*, Exp Cell Res **312** (2006) , no. 19, 3909-3919.
 216. J. Auwerx, B. Staels, F. Van Vaeck and J. L. Ceuppens, *Changes in igg fc receptor expression induced by phorbol 12-myristate 13-acetate treatment of thp-1 monocytic leukemia cells*, Leuk Res **16** (1992) , no. 3, 317-327.
 217. T. A. Kerr, M. A. Ciorba, H. Matsumoto, V. R. Davis, J. Luo, S. Kennedy, Y. Xie, A. Shaker, B. K. Dieckgraefe and N. O. Davidson, *Dextran sodium sulfate inhibition of real-time polymerase chain reaction amplification: A poly-a purification solution*, Inflamm Bowel Dis **18** (2012) , no. 2, 344-348.
 218. D. Rachmilewitz, E. Okon and F. Karmeli, *Sulphydryl blocker induced small intestinal inflammation in rats: A new model mimicking crohn's disease*, Gut **41** (1997) , no. 3, 358-365.
 219. G. Tolstanova, X. Deng, S. W. French, W. Lungo, B. Paunovic, T. Khomenko, A. Ahluwalia, T. Kaplan, M. Dacosta-Iyer, A. Tarnawski, S. Szabo and Z. Sandor, *Early*

- endothelial damage and increased colonic vascular permeability in the development of experimental ulcerative colitis in rats and mice*, Lab Invest **92** (2012) , no. 1, 9-21.
220. G. H. Tesch, S. Maifert, A. Schwarting, B. J. Rollins and V. R. Kelley, *Monocyte chemoattractant protein 1-dependent leukocytic infiltrates are responsible for autoimmune disease in mrl-fas (lpr) mice*, J Exp Med **190** (1999) , no. 12, 1813-1824.
 221. H. C. Reinecker, E. Y. Loh, D. J. Ringler, A. Mehta, J. L. Rombeau and R. P. MacDermott, *Monocyte-chemoattractant protein 1 gene expression in intestinal epithelial cells and inflammatory bowel disease mucosa*, Gastroenterology **108** (1995) , no. 1, 40-50.
 222. E. Hoffmann, O. Dittrich-Breiholz, H. Holtmann and M. Kracht, *Multiple control of interleukin-8 gene expression*, J Leukoc Biol **72** (2002) , no. 5, 847-855.
 223. Y. Zhang, W. Sime, M. Juhas and A. Sjölander, *Crosstalk between colon cancer cells and macrophages via inflammatory mediators and cd47 promotes tumour cell migration*, Eur J Cancer **49** (2013) , no. 15, 3320-3334.
 224. T. Sergent, N. Piront, J. Meurice, O. Toussaint and Y. J. Schneider, *Anti-inflammatory effects of dietary phenolic compounds in an in vitro model of inflamed human intestinal epithelium*, Chem Biol Interact **188** (2010) , no. 3, 659-667.
 225. S. Kitajima, S. Takuma and M. Morimoto, *Tissue distribution of dextran sulfate sodium (dss) in the acute phase of murine dss-induced colitis*, J Vet Med Sci **61** (1999) , no. 1, 67-70.
 226. .
 227. S. Wirtz, C. Neufert, B. Weigmann and M. F. Neurath, *Chemically induced mouse models of intestinal inflammation*, Nat Protoc **2** (2007) , no. 3, 541-546.
 228. P. Dharmani, P. Leung and K. Chadee, *Tumor necrosis factor- α and muc2 mucin play major roles in disease onset and progression in dextran sodium sulphate-induced colitis*, PLoS One **6** (2011) , no. 9, e25058.
 229. F. F. Sun, P. S. Lai, G. Yue, K. Yin, R. G. Nagele, D. M. Tong, R. F. Krzesicki, J. E. Chin and P. Y. Wong, *Pattern of cytokine and adhesion molecule mrna in hapten-induced relapsing colon inflammation in the rat*, Inflammation **25** (2001) , no. 1, 33-45.
 230. F. Karmeli, P. Cohen and D. Rachmilewitz, *Cyclo-oxygenase-2 inhibitors ameliorate the severity of experimental colitis in rats*, Eur J Gastroenterol Hepatol **12** (2000) , no. 2, 223-231.
 231. F. Caprioli, F. Bosè, R. L. Rossi, L. Petti, C. Viganò, C. Ciafardini, L. Raeli, G. Basilisco, S. Ferrero, M. Pagani, D. Conte, G. Altomare, G. Monteleone, S. Abrignani and E. Reali, *Reduction of cd68+ macrophages and decreased il-17 expression in intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease strongly correlate with endoscopic response and mucosal healing following infliximab therapy*, Inflamm Bowel Dis **19** (2013) , no. 4, 729-739.
 232. E. Reichman-Warmusz, J. Kurek, A. Gabriel, M. Brzozowa, G. Buła, K. Helewski, D. Domal-Kwiatkowska, J. Gawrychowski and R. Wojnicz, *Tissue hemostasis and chronic inflammation in colon biopsies of patients with inflammatory bowel disease*, Pathol Res Pract **208** (2012) , no. 9, 553-556.
 233. R. B. Sartor, *Mechanisms of disease: Pathogenesis of crohn's disease and ulcerative colitis*, Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol **3** (2006) , no. 7, 390-407.
 234. H. S. Oz, T. S. Chen and H. Nagasawa, *Comparative efficacies of 2 cysteine prodrugs and a glutathione delivery agent in a colitis model*, Transl Res **150** (2007) , no. 2, 122-129.
 235. I. Matos, A. F. Bento, R. Marcon, R. F. Claudino and J. B. Calixto, *Preventive and therapeutic oral administration of the pentacyclic triterpene α,β -amyrin ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice: The relevance of cannabinoid system*, Mol Immunol **54** (2013) , no. 3-4, 482-492.
 236. S. Periasamy, D. Z. Hsu, V. R. Chandrasekaran and M. Y. Liu, *Sesame oil accelerates healing of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced acute colitis by*

- attenuating inflammation and fibrosis*, JPEN J Parenter Enteral Nutr **37** (2013) , no. 5, 674-682.
237. K. Reinecke, S. Eminel, F. Dierck, W. Roessner, S. Kersting, A. M. Chromik, O. Gavrilova, A. Laukeviciene, I. Leuschner, V. Waetzig, P. Rosenstiel, T. Herdegen and C. Sina, *The jnk inhibitor xg-102 protects against tnbs-induced colitis*, PLoS One **7** (2012) , no. 3, e30985.
 238. J. Ablin, O. Shalev, E. Okon, F. Karmeli and D. Rachmilewitz, *Deferiprone, an oral iron chelator, ameliorates experimental colitis and gastric ulceration in rats*, Inflamm Bowel Dis **5** (1999) , no. 4, 253-261.
 239. R. Eliakim, F. Karmeli, P. Cohen, D. Rachmilewitz, J. S. Shao and D. H. Alpers, *Sulphydryl blocker-induced rat colitis is ameliorated by intravenous injection of antibody to colonic surfactant-like particle*, Inflamm Bowel Dis **5** (1999) , no. 1, 16-23.
 240. I. L. Bonta and S. Ben-Efraim, *Involvement of inflammatory mediators in macrophage antitumor activity*, J Leukoc Biol **54** (1993) , no. 6, 613-626.
 241. A. Amanzada, I. A. Malik, M. Blaschke, S. Khan, H. Rahman, G. Ramadori and F. Moriconi, *Identification of cd68 (+) neutrophil granulocytes in in vitro model of acute inflammation and inflammatory bowel disease*, Int J Clin Exp Pathol **6** (2013) , no. 4, 561-570.
 242. S. Ardizzone and G. Bianchi Porro, *Biologic therapy for inflammatory bowel disease*, Drugs **65** (2005) , no. 16, 2253-2286.
 243. J. H. Chidlow, W. Langston, J. J. Greer, D. Ostanin, M. Abdelbaqi, J. Houghton, A. Senthikumar, D. Shukla, A. P. Mazar, M. B. Grisham and C. G. Kevil, *Differential angiogenic regulation of experimental colitis*, Am J Pathol **169** (2006) , no. 6, 2014-2030.
 244. F. Scaldaferri, S. Vetrano, M. Sans, V. Arena, G. Straface, E. Stigliano, A. Repici, A. Sturm, A. Malesci, J. Panes, S. Yla-Herttuala, C. Fiocchi and S. Danese, *Vegf-a links angiogenesis and inflammation in inflammatory bowel disease pathogenesis*, Gastroenterology **136** (2009) , no. 2, 585-595.e585.
 245. N. Kopanakis, A. Saiti, E. D'Avgerinos, K. Masselou, M. Simiri, A. Mandaraka, G. Vasiliadis and V. Katergiannakis, *Serum vegf and bfgf in patients with inflammatory bowel diseases*, Ann Ital Chir **85** (2014) , no. 3, 203-206.
 246. Y. Shiratora, S. Aoki, H. Takada, H. Kiriyaama, K. Ohto, K. Hai, H. Teraoka, S. Matano, K. Matsumoto and K. Kamii, *Oxygen-derived free radical generating capacity of polymorphonuclear cells in patients with ulcerative colitis*, Digestion **44** (1989) , no. 3, 163-171.
 247. S. Bogaert, D. Laukens, H. Peeters, L. Melis, K. Olievier, N. Boon, G. Verbruggen, J. Vandesompele, D. Elewaut and M. De Vos, *Differential mucosal expression of th17-related genes between the inflamed colon and ileum of patients with inflammatory bowel disease*, BMC Immunol **11** (2010) , 61.
 248. G. Biesiada, J. Czepiel, A. Ptak-Belowska, A. Targosz, G. Krzysiek-Maczka, M. Strzalka, S. J. Konturek, T. Brzozowski and T. Mach, *Expression and release of leptin and proinflammatory cytokines in patients with ulcerative colitis and infectious diarrhea*, J Physiol Pharmacol **63** (2012) , no. 5, 471-481.
 249. G. P. Christophi, R. Rong, P. G. Holtzaple, P. T. Massa and S. K. Landas, *Immune markers and differential signaling networks in ulcerative colitis and crohn's disease*, Inflamm Bowel Dis **18** (2012) , no. 12, 2342-2356.
 250. K. A. Barada, F. H. Mourad, S. I. Sawah, C. Khoury, B. Safieh-Garabedian, C. F. Nassar and N. E. Saadé, *Localized colonic inflammation increases cytokine levels in distant small intestinal segments in the rat*, Life Sci **79** (2006) , no. 21, 2032-2042.
 251. K. A. Barada, F. H. Mourad, S. I. Sawah, C. Khoury, B. Safieh-Garabedian, C. F. Nassar, A. Tawil, A. Jurjus and N. E. Saadé, *Up-regulation of nerve growth factor and interleukin-10 in inflamed and non-inflamed intestinal segments in rats with experimental colitis*, Cytokine **37** (2007) , no. 3, 236-245.
 252. Y. Y. Li, B. Yuece, H. M. Cao, H. X. Lin, S. Lv, J. C. Chen, S. Ochs, A. Sibaev, E. Deindl, C. Schaefer and M. Storr, *Inhibition of p38/mk2 signaling pathway improves*

- the anti-inflammatory effect of win55 on mouse experimental colitis*, Lab Invest **93** (2013) , no. 3, 322-333.
253. K. Celinski, T. Dworzanski, A. Korolczuk, R. Piasecki, M. Slomka, A. Madro and R. Fornal, *Effects of peroxisome proliferator-activated receptors-gamma ligands on dextran sodium sulphate-induced colitis in rats*, J Physiol Pharmacol **62** (2011) , no. 3, 347-356.
 254. R. Ito, M. Shin-Ya, T. Kishida, A. Urano, R. Takada, J. Sakagami, J. Imanishi, M. Kita, Y. Ueda, Y. Iwakura, K. Kataoka, T. Okanoue and O. Mazda, *Interferon-gamma is causatively involved in experimental inflammatory bowel disease in mice*, Clin Exp Immunol **146** (2006) , no. 2, 330-338.
 255. C. Kriegel and M. Amiji, *Oral tnfr- α gene silencing using a polymeric microsphere-based delivery system for the treatment of inflammatory bowel disease*, J Control Release **150** (2011) , no. 1, 77-86.
 256. K. A. Kuhn, N. A. Manieri, T. C. Liu and T. S. Stappenbeck, *Il-6 stimulates intestinal epithelial proliferation and repair after injury*, PLoS One **9** (2014) , no. 12, e114195.
 257. Y. Takada, T. Hisamatsu, N. Kamada, M. T. Kitazume, H. Honda, Y. Oshima, R. Saito, T. Takayama, T. Kobayashi, H. Chinen, Y. Mikami, T. Kanai, S. Okamoto and T. Hibi, *Monocyte chemoattractant protein-1 contributes to gut homeostasis and intestinal inflammation by composition of il-10-producing regulatory macrophage subset*, J Immunol **184** (2010) , no. 5, 2671-2676.
 258. K. Kusugami, A. Fukatsu, M. Tanimoto, M. Shinoda, J. Haruta, A. Kuroiwa, K. Ina, K. Kanayama, T. Ando and T. Matsuura, *Elevation of interleukin-6 in inflammatory bowel disease is macrophage- and epithelial cell-dependent*, Dig Dis Sci **40** (1995) , no. 5, 949-959.
 259. K. Kusugami, T. Ando, A. Imada, K. Ina, M. Ohsuga, T. Shimizu, T. Sakai, T. Konagaya and H. Kaneko, *Mucosal macrophage inflammatory protein-1 α activity in helicobacter pylori infection*, J Gastroenterol Hepatol **14** (1999) , no. 1, 20-26.
 260. K. A. Papadakis and S. R. Targan, *Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease*, Annu Rev Med **51** (2000) , 289-298.
 261. R. P. MacDermott, I. R. Sanderson and H. C. Reinecker, *The central role of chemokines (chemotactic cytokines) in the immunopathogenesis of ulcerative colitis and crohn's disease*, Inflamm Bowel Dis **4** (1998) , no. 1, 54-67.
 262. M. C. Grimm, S. K. Elsbury, P. Pavli and W. F. Doe, *Enhanced expression and production of monocyte chemoattractant protein-1 in inflammatory bowel disease mucosa*, J Leukoc Biol **59** (1996) , no. 6, 804-812.
 263. E. K. Ng, N. Panesar, W. E. Longo, M. J. Shapiro, D. L. Kaminski, K. C. Tolman and J. E. Mazuski, *Human intestinal epithelial and smooth muscle cells are potent producers of il-6*, Mediators Inflamm **12** (2003) , no. 1, 3-8.
 264. J. O. Mascarenhas, M. E. Goodrich, H. Eichelberger and D. W. McGee, *Polarized secretion of il-6 by iec-6 intestinal epithelial cells: Differential effects of il-1 beta and tnfr-alpha*, Immunol Invest **25** (1996) , no. 4, 333-340.
 265. C. Zhou, Z. Liu, J. Jiang, Y. Yu and Q. Zhang, *Differential gene expression profiling of porcine epithelial cells infected with three enterotoxigenic escherichia coli strains*, BMC Genomics **13** (2012) , 330.
 266. J. Wang, G. Hu, Z. Lin, L. He, L. Xu and Y. Zhang, *Characteristic and functional analysis of a newly established porcine small intestinal epithelial cell line*, PLoS One **9** (2014) , no. 10, e110916.
 267. M. S. Malo, S. Biswas, M. A. Abedrapo, L. Yeh, A. Chen and R. A. Hodin, *The pro-inflammatory cytokines, il-1beta and tnfr-alpha, inhibit intestinal alkaline phosphatase gene expression*, DNA Cell Biol **25** (2006) , no. 12, 684-695.
 268. K. Poelstra, W. W. Bakker, P. A. Klok, M. J. Hardonk and D. K. Meijer, *A physiologic function for alkaline phosphatase: Endotoxin detoxification*, Lab Invest **76** (1997) , no. 3, 319-327.
 269. J. C. Hoffmann, M. Zeitz, S. C. Bischoff, H. J. Brambs, H. P. Bruch, H. J. Buhr, A. Dignass, I. Fischer, W. Fleig, U. R. Fölsch, K. Herrlinger, W. Höhne, G. Jantschek, B. Kaltz, K. M. Keller, U. Knebel, A. J. Kroesen, W. Kruis, H. Matthes, G. Moser, S.

- Mundt, C. Pox, M. Reinshagen, A. Reissmann, J. Riemann, G. Rogler, W. Schmiegell, J. Schölmerich, S. Schreiber, O. Schwandner, H. K. Selbmann, E. F. Stange, M. Utzig and C. Wittekind, *[diagnosis and therapy of ulcerative colitis: Results of an evidence based consensus conference by the german society of digestive and metabolic diseases and the competence network on inflammatory bowel disease]*, *Z Gastroenterol* **42** (2004) , no. 9, 979-983.
270. H. Zhang, X. Zhang, X. Ding, W. Cao, L. Qu and G. Zhou, *Effect of secondary lymphoid tissue chemokine suppression on experimental ulcerative colitis in mice*, *Genet Mol Res* **13** (2014) , no. 2, 3337-3345.
271. A. Motavallian, M. Minaian, M. Rabbani, S. Andalib and P. Mahzouni, *Involvement of 5ht3 receptors in anti-inflammatory effects of tropisetron on experimental tnbs-induced colitis in rat*, *Bioimpacts* **3** (2013) , no. 4, 169-176.
272. K. C. Reuter, C. R. Grunwitz, B. M. Kaminski, D. Steinhilber, H. H. Radeke and J. Stein, *Selective glucocorticoid receptor agonists for the treatment of inflammatory bowel disease: Studies in mice with acute trinitrobenzene sulfonic acid colitis*, *J Pharmacol Exp Ther* **341** (2012) , no. 1, 68-80.
273. S. F. Ghasemi-Niri, A. H. Abdolghaffari, S. Fallah-Benakohal, M. Hosseinpour-Feizi, P. Mahdavian, H. Jamalifar, M. Baeeri, G. Dehghan and M. Abdollahi, *On the benefit of whey-cultured lactobacillus casei in murine colitis*, *J Physiol Pharmacol* **62** (2011) , no. 3, 341-346.
274. T. Szikszai, F. Lasitschka, T. Giese, M. Greulich, Y. S. Lee, J. Ilse, S. Schiessling, C. Leowardi, M. Al-Saeedi, J. Winter, S. Meuer and J. Schröder-Braunstein, *Standardization of a human organ culture model of intestinal inflammation and its application for drug testing*, *J Immunol Methods* (2014) .
275. F. M. Ruemmele, S. Dionne, E. Levy and E. G. Seidman, *Dexamethasone inhibits ifngamma-induced mhc class ii expression of intestinal epithelial cells independently of the tgfbeta1 regulatory pathway*, *Aliment Pharmacol Ther* **13** (1999) , no. 5, 595-601.
276. I. M. Adcock and G. Caramori, *Cross-talk between pro-inflammatory transcription factors and glucocorticoids*, *Immunol Cell Biol* **79** (2001) , no. 4, 376-384.
277. S. C. TRUELOVE, G. WATKINSON and G. DRAPER, *Comparison of corticosteroid and sulphasalazine therapy in ulcerative colitis*, *Br Med J* **2** (1962) , no. 5321, 1708-1711.
278. J. E. LENNARD-JONES, A. J. LONGMORE, A. C. NEWELL, C. W. WILSON and F. A. JONES, *An assessment of prednisone, salazopyrin, and topical hydrocortisone hemisuccinate used as out-patient treatment for ulcerative colitis*, *Gut* **1** (1960) , 217-222.
279. H. Matthes, T. Krummenerl, M. Giensch, C. Wolff and J. Schulze, *Clinical trial: Probiotic treatment of acute distal ulcerative colitis with rectally administered escherichia coli nissle 1917 (ecn)*, *BMC Complement Altern Med* **10** (2010) , 13.
280. B. J. Loew and C. A. Siegel, *Foam preparations for the treatment of ulcerative colitis*, *Curr Drug Deliv* (2011) .
281. J. M. Otte and D. K. Podolsky, *Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms*, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286** (2004) , no. 4, G613-626.
282. L. D. Prisciandaro, M. S. Geier, R. N. Butler, A. G. Cummins and G. S. Howarth, *Evidence supporting the use of probiotics for the prevention and treatment of chemotherapy-induced intestinal mucositis*, *Crit Rev Food Sci Nutr* **51** (2011) , no. 3, 239-247.
283. A. K. Güttsches, S. Löseke, U. Zähringer, U. Sonnenborn, C. Enders, S. Gatermann and A. Bufe, *Anti-inflammatory modulation of immune response by probiotic escherichia coli nissle 1917 in human blood mononuclear cells*, *Innate Immun* **18** (2012) , no. 2, 204-216.
284. N. Kamada, K. Maeda, N. Inoue, T. Hisamatsu, S. Okamoto, K. S. Hong, T. Yamada, N. Watanabe, K. Tsuchimoto, H. Ogata and T. Hibi, *Nonpathogenic escherichia coli strain nissle 1917 inhibits signal transduction in intestinal epithelial cells*, *Infect Immun* **76** (2008) , no. 1, 214-220.

285. J. Boudeau, A. L. Glasser, S. Julien, J. F. Colombel and A. Darfeuille-Michaud, *Inhibitory effect of probiotic escherichia coli strain nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive e. Coli strains isolated from patients with crohn's disease*, *Aliment Pharmacol Ther* **18** (2003) , no. 1, 45-56.
286. P. Schierack, S. Kleta, K. Tedin, J. T. Babila, S. Oswald, T. A. Oelschlaeger, R. Hiemann, S. Paetzold and L. H. Wieler, *E. Coli nissle 1917 affects salmonella adhesion to porcine intestinal epithelial cells*, *PLoS One* **6** (2011) , no. 2, e14712.
287. A. Darfeuille-Michaud, J. Boudeau, P. Bulois, C. Neut, A. L. Glasser, N. Barnich, M. A. Bringer, A. Swidsinski, L. Beaugerie and J. F. Colombel, *High prevalence of adherent-invasive escherichia coli associated with ileal mucosa in crohn's disease*, *Gastroenterology* **127** (2004) , no. 2, 412-421.
288. C. P. Tamboli, C. Neut, P. Desreumaux and J. F. Colombel, *Dysbiosis in inflammatory bowel disease*, *Gut* **53** (2004) , no. 1, 1-4.
289. G. W. Tannock, K. Munro, H. J. Harmsen, G. W. Welling, J. Smart and P. K. Gopal, *Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing lactobacillus rhamnosus dr20*, *Appl Environ Microbiol* **66** (2000) , no. 6, 2578-2588.
290. K. M. Lammers, U. Helwig, E. Swennen, F. Rizzello, A. Venturi, E. Caramelli, M. A. Kamm, P. Brigidi, P. Gionchetti and M. Campieri, *Effect of probiotic strains on interleukin 8 production by ht29/19a cells*, *Am J Gastroenterol* **97** (2002) , no. 5, 1182-1186.
291. A. Baeuerlein, S. Ackermann and A. Parlesak, *Transepithelial activation of human leukocytes by probiotics and commensal bacteria: Role of enterobacteriaceae-type endotoxin*, *Microbiol Immunol* **53** (2009) , no. 4, 241-250.
292. J. B. Kaper, J. P. Nataro and H. L. Mobley, *Pathogenic escherichia coli*, *Nat Rev Microbiol* **2** (2004) , no. 2, 123-140.
293. K. Hayashi, N. Morooka, Y. Yamamoto, K. Fujita, K. Isono, S. Choi, E. Ohtsubo, T. Baba, B. L. Wanner, H. Mori and T. Horiuchi, *Highly accurate genome sequences of escherichia coli k-12 strains mg1655 and w3110*, *Mol Syst Biol* **2** (2006) , 2006.0007.
294. H. R. Christensen, H. Frøkiaer and J. J. Pestka, *Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells*, *J Immunol* **168** (2002) , no. 1, 171-178.
295. D. Ma, P. Forsythe and J. Bienenstock, *Live lactobacillus rhamnosus [corrected] is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression*, *Infect Immun* **72** (2004) , no. 9, 5308-5314.
296. L. Peran, S. Sierra, M. Comalada, F. Lara-Villoslada, E. Bailón, A. Nieto, A. Concha, M. Olivares, A. Zarzuelo, J. Xaus and J. Gálvez, *A comparative study of the preventative effects exerted by two probiotics, lactobacillus reuteri and lactobacillus fermentum, in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis*, *Br J Nutr* **97** (2007) , no. 1, 96-103.
297. T. E. Christoffersen, L. T. Hult, K. Kuczkowska, K. M. Moe, S. Skeie, T. Lea and C. R. Kleiveland, *In vitro comparison of the effects of probiotic, commensal and pathogenic strains on macrophage polarization*, *Probiotics Antimicrob Proteins* **6** (2014) , no. 1, 1-10.
298. J. Wehkamp, J. Harder, K. Wehkamp, B. Wehkamp-von Meissner, M. Schlee, C. Enders, U. Sonnenborn, S. Nuding, S. Bengmark, K. Fellermann, J. M. Schröder and E. F. Stange, *Nf-kappab- and ap-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by escherichia coli nissle 1917: A novel effect of a probiotic bacterium*, *Infect Immun* **72** (2004) , no. 10, 5750-5758.
299. C. B. Maassen, C. van Holten-Neelen, F. Balk, M. J. den Bak-Glashouwer, R. J. Leer, J. D. Laman, W. J. Boersma and E. Claassen, *Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered lactobacillus strains*, *Vaccine* **18** (2000) , no. 23, 2613-2623.
300. U. Helwig, K. M. Lammers, F. Rizzello, P. Brigidi, V. Rohleder, E. Caramelli, P. Gionchetti, J. Schrezenmeir, U. R. Foelsch, S. Schreiber and M. Campieri, *Lactobacilli, bifidobacteria and e. Coli nissle induce pro- and anti-inflammatory*

- cytokines in peripheral blood mononuclear cells*, World J Gastroenterol **12** (2006) , no. 37, 5978-5986.
301. Y. Chen, W. L. Liu, T. H. Zhou, J. T. Cai, Q. Du, L. J. Wang, J. G. Wu and J. M. Si, *Therapeutic effects of rectal administration of muscovite on experimental colitis in rats*, J Gastroenterol Hepatol **24** (2009) , no. 5, 912-919.
 302. K. E. Zychowski, S. E. Elmore, K. A. Rychlik, H. J. Ly, F. Pierezan, A. Isaiah, J. S. Suchodolski, A. R. Hoffmann, A. A. Romoser and T. D. Phillips, *Mitigation of colitis with novasil clay therapy*, Dig Dis Sci **60** (2015) , no. 2, 382-392.
 303. L. J. Wang, S. J. Chen and J. M. Si, *[intestinal mucosa protection of muscovite n ulcerative colitis in rats]*, Zhongguo Zhong Yao Za Zhi **30** (2005) , no. 23, 1840-1844.
 304. H. Seno, H. Miyoshi, S. L. Brown, M. J. Geske, M. Colonna and T. S. Stappenbeck, *Efficient colonic mucosal wound repair requires trem2 signaling*, Proc Natl Acad Sci U S A **106** (2009) , no. 1, 256-261.
 305. K. R. Ward, M. H. Tiba, W. H. Holbert, C. R. Blocher, G. T. Draucker, E. K. Proffitt, G. L. Bowlin, R. R. Ivatury and R. F. Diegelmann, *Comparison of a new hemostatic agent to current combat hemostatic agents in a swine model of lethal extremity arterial hemorrhage*, J Trauma **63** (2007) , no. 2, 276-283; discussion 283-274.
 306. T. Gerlach, J. K. Grayson, K. O. Pichakron, M. J. Sena, S. D. DeMartini, B. Z. Clark, J. S. Estep and D. Zierold, *Preliminary study of the effects of smectite granules (woundstat) on vascular repair and wound healing in a swine survival model*, J Trauma **69** (2010) , no. 5, 1203-1209.
 307. R. F. Bellamy, D. C. Pedersen and L. R. DeGuzman, *Organ blood flow and the cause of death following massive hemorrhage*, Circ Shock **14** (1984) , no. 2, 113-127.
 308. H. R. Champion, R. F. Bellamy, C. P. Roberts and A. Leppaniemi, *A profile of combat injury*, J Trauma **54** (2003) , no. 5 Suppl, S13-19.
 309. A. Sauaia, F. A. Moore, E. E. Moore, K. S. Moser, R. Brennan, R. A. Read and P. T. Pons, *Epidemiology of trauma deaths: A reassessment*, J Trauma **38** (1995) , no. 2, 185-193.
 310. D. Varga-Szabo, I. Pleines and B. Nieswandt, *Cell adhesion mechanisms in platelets*, Arterioscler Thromb Vasc Biol **28** (2008) , no. 3, 403-412.
 311. T. M. McIntyre, S. M. Prescott, A. S. Weyrich and G. A. Zimmerman, *Cell-cell interactions: Leukocyte-endothelial interactions*, Curr Opin Hematol **10** (2003) , no. 2, 150-158.
 312. L. F. Brass and M. Molino, *Protease-activated g protein-coupled receptors on human platelets and endothelial cells*, Thromb Haemost **78** (1997) , no. 1, 234-241.
 313. Z. M. Ruggeri, *Mechanisms initiating platelet thrombus formation*, Thromb Haemost **78** (1997) , no. 1, 611-616.
 314. K. Aoki, *A study of endotoxemia in ulcerative colitis and crohn's disease. li. Experimental study*, Acta Med Okayama **32** (1978) , no. 3, 207-216.
 315. R. E. Bryant, A. L. Rashad, J. A. Mazza and D. Hammond, *Beta-lactamase activity in human pus*, J Infect Dis **142** (1980) , no. 4, 594-601.
 316. H. P. Simmen, H. Battaglia, P. Giovanoli and J. Blaser, *Analysis of ph, po2 and pco2 in drainage fluid allows for rapid detection of infectious complications during the follow-up period after abdominal surgery*, Infection **22** (1994) , no. 6, 386-389.
 317. B. Månsson, P. Geborek, T. Saxne and S. Björnsson, *Cytidine deaminase activity in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis: Relation to lactoferrin, acidosis, and cartilage proteoglycan release*, Ann Rheum Dis **49** (1990) , no. 8, 594-597.
 318. T. D. Pollard and G. G. Borisy, *Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments*, Cell **112** (2003) , no. 4, 453-465.
 319. J. Fallingborg, L. A. Christensen, B. A. Jacobsen and S. N. Rasmussen, *Very low intraluminal colonic ph in patients with active ulcerative colitis*, Dig Dis Sci **38** (1993) , no. 11, 1989-1993.
 320. P. Vernia, R. Caprilli, G. Latella, F. Barbetti, F. M. Magliocca and M. Cittadini, *Fecal lactate and ulcerative colitis*, Gastroenterology **95** (1988) , no. 6, 1564-1568.

321. Q. Shi, X. Le, B. Wang, Q. Xiong, J. L. Abbruzzese and K. Xie, *Regulation of interleukin-8 expression by cellular ph in human pancreatic adenocarcinoma cells*, J Interferon Cytokine Res **20** (2000) , no. 11, 1023-1028.
322. C. C. Jancic, M. Cabrini, M. L. Gabelloni, C. Rodríguez Rodríguez, G. Salamone, A. S. Trevani and J. Geffner, *Low extracellular ph stimulates the production of il-1 β by human monocytes*, Cytokine **57** (2012) , no. 2, 258-268.
323. S. H. Zigmond and R. L. Hargrove, *Orientation of pmn in a ph gradient: Acid-induced release of a chemotactic factor*, J Immunol **126** (1981) , no. 2, 478-481.
324. A. S. Trevani, G. Andonegui, M. Giordano, D. H. López, R. Gamberale, F. Minucci and J. R. Geffner, *Extracellular acidification induces human neutrophil activation*, J Immunol **162** (1999) , no. 8, 4849-4857.
325. T. Kasahara, N. Mukaida, K. Yamashita, H. Yagisawa, T. Akahoshi and K. Matsushima, *Il-1 and tnfr-alpha induction of il-8 and monocyte chemotactic and activating factor (mcaf) mrna expression in a human astrocytoma cell line*, Immunology **74** (1991) , no. 1, 60-67.
326. S. Segerer, P. J. Nelson and D. Schlöndorff, *Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: From basic science to pathophysiologic and therapeutic studies*, J Am Soc Nephrol **11** (2000) , no. 1, 152-176.
327. A. Panja, S. Goldberg, L. Eckmann, P. Krishen and L. Mayer, *The regulation and functional consequence of proinflammatory cytokine binding on human intestinal epithelial cells*, J Immunol **161** (1998) , no. 7, 3675-3684.
328. P. Schling, C. Rudolph, S. Heimerl, S. Fruth and G. Schmitz, *Expression of tumor necrosis factor alpha and its receptors during cellular differentiation*, Cytokine **33** (2006) , no. 5, 239-245.
329. T. Lesuffleur, A. Barbat, E. Dussaulx and A. Zweibaum, *Growth adaptation to methotrexate of ht-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells*, Cancer Res **50** (1990) , no. 19, 6334-6343.
330. S. Piegholdt, K. Pallauf, T. Esatbeyoglu, N. Speck, K. Reiss, L. Ruddigkeit, A. Stocker, P. Huebbe and G. Rimbach, *Biochanin a and prunetin improve epithelial barrier function in intestinal caco-2 cells via downregulation of erk, nf-kb, and tyrosine phosphorylation*, Free Radic Biol Med **70** (2014) , 255-264.
331. G. W. Moran, C. O'Neill and J. T. McLaughlin, *Glp-2 enhances barrier formation and attenuates tnfa-induced changes in a caco-2 cell model of the intestinal barrier*, Regul Pept **178** (2012) , no. 1-3, 95-101.
332. A. H. Gitter, K. Bendfeldt, H. Schmitz, J. D. Schulzke, C. J. Bentzel and M. Fromm, *Epithelial barrier defects in ht-29/b6 colonic cell monolayers induced by tumor necrosis factor-alpha*, Ann N Y Acad Sci **915** (2000) , 193-203.
333. T. W. Costantini, J. Deree, W. Loomis, J. G. Putnam, S. Choi, A. Baird, B. P. Eliceiri, V. Bansal and R. Coimbra, *Phosphodiesterase inhibition attenuates alterations to the tight junction proteins occludin and zo-1 in immunostimulated caco-2 intestinal monolayers*, Life Sci **84** (2009) , no. 1-2, 18-22.
334. D. I. Sonnier, S. R. Bailey, R. M. Schuster, M. M. Gangidine, A. B. Lentsch and T. A. Pritts, *Proinflammatory chemokines in the intestinal lumen contribute to intestinal dysfunction during endotoxemia*, Shock **37** (2012) , no. 1, 63-69.
335. S. M. Stamatovic, R. F. Keep, S. L. Kunkel and A. V. Andjelkovic, *Potential role of mcp-1 in endothelial cell tight junction 'opening': Signaling via rho and rho kinase*, J Cell Sci **116** (2003) , no. Pt 22, 4615-4628.
336. O. B. Dimitrijevic, S. M. Stamatovic, R. F. Keep and A. V. Andjelkovic, *Effects of the chemokine ccl2 on blood-brain barrier permeability during ischemia-reperfusion injury*, J Cereb Blood Flow Metab **26** (2006) , no. 6, 797-810.
337. E. A. Eugenin, K. Osiecki, L. Lopez, H. Goldstein, T. M. Calderon and J. W. Berman, *Ccl2/monocyte chemoattractant protein-1 mediates enhanced transmigration of human immunodeficiency virus (hiv) -infected leukocytes across the blood-brain barrier: A potential mechanism of hiv-cns invasion and neuroaids*, J Neurosci **26** (2006) , no. 4, 1098-1106.

338. S. Vallee, S. Laforest, F. Fouchier, M. P. Montero, C. Penel and S. Champion, *Cytokine-induced upregulation of nf-kappab, il-8, and icam-1 is dependent on colonic cell polarity: Implication for pkcdelta*, Exp Cell Res **297** (2004) , no. 1, 165-185.
339. W. L. Biffl, E. E. Moore, F. A. Moore, V. S. Carl, R. J. Franciose and A. Banerjee, *Interleukin-8 increases endothelial permeability independent of neutrophils*, J Trauma **39** (1995) , no. 1, 98-102; discussion 102-103.
340. I. U. Schraufstatter, J. Chung and M. Burger, *Il-8 activates endothelial cell cxcr1 and cxcr2 through rho and rac signaling pathways*, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **280** (2001) , no. 6, L1094-1103.
341. M. B. Dwinell, L. Eckmann, J. D. Leopard, N. M. Varki and M. F. Kagnoff, *Chemokine receptor expression by human intestinal epithelial cells*, Gastroenterology **117** (1999) , no. 2, 359-367.
342. A. Sturm, D. C. Baumgart, J. H. d'Heureuse, A. Hotz, B. Wiedenmann and A. U. Dignass, *Cxcl8 modulates human intestinal epithelial cells through a cxcr1 dependent pathway*, Cytokine **29** (2005) , no. 1, 42-48.
343. S. M. Moyes, J. F. Morris and K. E. Carr, *Macrophages increase microparticle uptake by enterocyte-like caco-2 cell monolayers*, J Anat **217** (2010) , no. 6, 740-754.
344. A. J. Watson and K. R. Hughes, *Tnf- α -induced intestinal epithelial cell shedding: Implications for intestinal barrier function*, Ann N Y Acad Sci **1258** (2012) , 1-8.
345. M. Amasheh, I. Grotjohann, S. Amasheh, A. Fromm, J. D. Söderholm, M. Zeitz, M. Fromm and J. D. Schulzke, *Regulation of mucosal structure and barrier function in rat colon exposed to tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in vitro: A novel model for studying the pathomechanisms of inflammatory bowel disease cytokines*, Scand J Gastroenterol **44** (2009) , no. 10, 1226-1235.
346. C. Bojarski, K. Bendfeldt, A. H. Gitter, J. Mankertz, M. Fromm, S. Wagner, E. O. Riecken and J. D. Schulzke, *Apoptosis and intestinal barrier function*, Ann N Y Acad Sci **915** (2000) , 270-274.
347. L. S. Poritz, K. I. Garver, A. F. Tilberg and W. A. Koltun, *Tumor necrosis factor alpha disrupts tight junction assembly*, J Surg Res **116** (2004) , no. 1, 14-18.
348. K. Traore, M. A. Trush, M. George, E. W. Spannhake, W. Anderson and A. Asseffa, *Signal transduction of phorbol 12-myristate 13-acetate (pma) -induced growth inhibition of human monocytic leukemia thp-1 cells is reactive oxygen dependent*, Leuk Res **29** (2005) , no. 8, 863-879.
349. S. S. Baker and C. L. Campbell, *Rat enterocyte injury by oxygen-dependent processes*, Gastroenterology **101** (1991) , no. 3, 716-720.
350. P. Renard and M. Raes, *The proinflammatory transcription factor nf-kappab: A potential target for novel therapeutical strategies*, Cell Biol Toxicol **15** (1999) , no. 6, 341-344.
351. A. M. Chavez, M. J. Menconi, R. A. Hodin and M. P. Fink, *Cytokine-induced intestinal epithelial hyperpermeability: Role of nitric oxide*, Crit Care Med **27** (1999) , no. 10, 2246-2251.
352. P. A. Juliet, T. Hayashi, A. Iguchi and L. J. Ignarro, *Concomitant production of nitric oxide and superoxide in human macrophages*, Biochem Biophys Res Commun **310** (2003) , no. 2, 367-370.
353. B. Jarmołowska, M. Teodorowicz, E. Fiedorowicz, E. Sienkiewicz-Szłapka, M. Matysiewicz and E. Kostyra, *Glucose and calcium ions may modulate the efficiency of bovine β -casomorphin-7 permeability through a monolayer of caco-2 cells*, Peptides **49** (2013) , 59-67.
354. L. Kruidenier, I. Kuiper, C. B. Lamers and H. W. Verspaget, *Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: Semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants*, J Pathol **201** (2003) , no. 1, 28-36.
355. A. Keshavarzian, S. Sedghi, J. Kanofsky, T. List, C. Robinson, C. Ibrahim and D. Winship, *Excessive production of reactive oxygen metabolites by inflamed colon: Analysis by chemiluminescence probe*, Gastroenterology **103** (1992) , no. 1, 177-185.

- 356. S. J. McKenzie, M. S. Baker, G. D. Buffinton and W. F. Doe, *Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease*, J Clin Invest **98** (1996) , no. 1, 136-141.
- 357. A. R. Parmar, P. P. Trivedi and G. B. Jena, *Dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis leads to testicular toxicity in mice: Role of inflammation, oxidative stress and dna damage*, Reprod Toxicol **49C** (2014) , 171-184.
- 358. M. E. Ginn-Pease and R. L. Whisler, *Redox signals and nf-kappab activation in t cells*, Free Radic Biol Med **25** (1998) , no. 3, 346-361.
- 359. D. Pan, C. S. Kenway-Lynch, W. Lala, R. S. Veazey, A. A. Lackner, A. Das and B. Pahar, *Lack of interleukin-10-mediated anti-inflammatory signals and upregulated interferon gamma production are linked to increased intestinal epithelial cell apoptosis in pathogenic simian immunodeficiency virus infection*, J Virol **88** (2014) , no. 22, 13015-13028.

10 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Histologischer Aufbau des Dünndarms und des Dickdarms.....	2
Abb. 2	Schematische Darstellung der Wirkungsweise von iAP nach Lallés et al. [1].....	11
Abb. 3	Schematische Darstellung vom Versuchsaufbau.	32
Abb. 4	Schematische Darstellung vom Versuchsaufbau.	44
Abb. 5	Messaufbau für TEER-Messung.	45
Abb. 6	Histologischer Schnitt eines Dünndarmsegmentes nach <i>in situ</i> -Perfusion des Kontrollmediums.....	46
Abb. 7	Histopathologische Veränderungen nach Schädigung mit IA (1 %).	48
Abb. 8	Darstellung der histologischen Entzündungs-Parameter an einem exemplarischen HE-Schnitt eines perfundierten Dünndarmsegmentes nach IA-Schädigung.	49
Abb. 9	Einfluss der IA-Perfusion auf den histologischen Score.	50
Abb. 10	Einfluss der IA-Perfusion auf die Infiltration von CD68 ⁺ -Zellen.....	50
Abb. 11	Einfluss der IA-Perfusion auf die Expression von Targetgenen.....	51
Abb. 12	Einfluss der IA-Perfusion auf die Histologie (A) und die Expression von IL-6 und MCP-1 (B) in proximalen und distalen Gewebeproben.	52
Abb. 13	Einfluss der Therapie-Perfusion auf die Histologie.....	54
Abb. 14	Einfluss der Therapie-Perfusion auf den histologischen Score	55
Abb. 15	Einfluss der Therapie-Perfusion auf die Infiltration von CD68 ⁺ -Zellen.	56
Abb. 16	Einfluss der Therapie-Perfusion auf die Expression von Targetgenen	57
Abb. 17	Effekte von Tonsuspensionen auf die Zellproliferation von Caco-2 (A) und SW480 (B)	59
Abb. 18	Effekte von Tonsuspensionen auf die Zellvitalität von Caco-2 (A) und SW480 (B)..	60
Abb. 19	Effekte von Tonsuspensionen auf die Expression von IL-8 und MCP-1 in Caco-2-Zellen (A + C) und SW480 (B + D)	62
Abb. 20	Effekte von Tonsuspensionen auf die IL-8-Konzentrationen in den Überstand von Caco-2-(A) und SW480-Zellkulturen (B)	63
Abb. 21	Effekte von Tonsuspensionen auf den transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER) von unstimulierten Caco-2.	64
Abb. 22	Effekte von Tonsuspensionen auf den transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER) von Caco-2-Zellen nach Stimulation mit TNF α (A) und THP-1-Makrophagen (B).....	65
Abb. 23	NF- κ B-Aktivierung nach Behandlung mit LPS, monophosphoryliertem Lipid A (LipA mo) oder diphosphoryliertem Lipid A (LipA di) sowie ciAP-vorbehandeltem Lipid A in IEC-6-Zellen. -	67
Abb. 24	NF- κ B Aktivierung nach Behandlung mit TNF- α , LPS und ciAP-vorbehandeltem LPS in IEC-6-Zellen	68

11 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Die zur mRNA-Quantifizierung am ABI Prism verwendeten Hybridisierungs- sonden ..	36
Tab. 2	Standard-Programm zur Amplifizierung von cDNA mittels PCR.....	37
Tab. 3	Verwendete Zelllinien	39
Tab. 4	Parameter für den histologischen Entzündungs-Score, modifiziert nach Satoh et al. [173].	49

Veröffentlichungen**ORIGINALARBEITEN**

Breitrueck A, Sparmann G, Kerkhoff C. Establishment of a novel extracorporeal bowel model to study luminal approaches to treat inflammatory bowel disease. Dis Model Mech. 2013;6: 1487-1493

KONGRESSBEITRÄGE

Breitrueck A, Krech M, Liebe S, Emmrich J. Detection of K-ras and p53 gene mutations and hypermethylation of p16 in colonic lavage of patients with chronic inflammatory bowel diseases. European Crohn's and Colitis organisation (ECCO). 2009

Breitrueck A, Sparmann G, Nowak D, Emmrich J. Screening for genetic alterations related to malignant transformation in inflammatory bowel disease. Digestive Disease Week (DDW). 2009

Breitrueck A, Sparmann G, Emmrich J. Establishment of a short time rat model of mucosal inflammation by in situ perfusion of an intestinal segment. ECCO. 2011

Breitrueck A, Sparmann G, Emmrich J. A short time rat model of mucosal inflammation by in situ perfusion of an intestinal segment. DDW. 2011

Breitrueck A, Sparmann G, Emmrich J. A new short time rat model of mucosal inflammation. World Congress of regenerative medicine. 2011

ZITIERFÄHIGE ABSTRACTS

Breitrueck A, Sparmann G, Nowak D, Emmrich J. Screening for genetic alterations related to malignant transformation in inflammatory bowel disease (IBD). Gastroenterology May 2009 Volume 136, Issue 5, Supplement 1, Page A-348

Breitrueck A, Sparmann G, Emmrich J. A short time rat model of mucosal inflammation by in situ perfusion of an intestinal segment. Gastroenterology 2011 Volume 140, Issue 5, Supplement 1, Page S-697

PRÄSENTATIONEN

„Nachweis von tumorspezifischen Markern bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen“. 2009, 22. Jahrestagung der Deutsche Arbeitsgemeinschaft Chronisch Entzündlicher Darmerkrankungen (DACHED)

„Etablierung eines Kurzzeitschädigungsmodells der Mukosa mithilfe der in situ Perfusion eines Rattendünndarmsegmentes“. 2010, 23. Jahrestagung der DACHED

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem ehemaligen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Jörg Emmrich, für die Bereitstellung des Forschungsthemas und die Möglichkeit, diese Arbeit im Forschungslabor der Gastroenterologie anfertigen zu können. Seine wissenschaftliche Betreuung, die zahlreichen Anregungen und sein großer Erfahrungsschatz waren entscheidend für die erfolgreiche Etablierung des Kurzzeitschädigungsmodells. Sein plötzlicher Tod war und ist ein schmerzvoller Verlust für alle ehemaligen Kolleginnen und Kollegen und Wegbegleiter.

Besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Claus Kerkhoff, der nach dem Tod von Prof. Emmrich die Betreuung meiner Arbeit übernommen hat und meine Forschungsarbeit mit großem Engagement begleitete und förderte.

Zudem möchte ich Frau Prof. Dr. Ulrike Gimsa für ihre Bereitschaft, die Arbeit zu begutachten, danken.

Dem gesamten Forschungslabor der Gastroenterologie danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit, wobei ich einige Kolleginnen und Kollegen besonders hervorheben möchte:

Zunächste möchte ich mich bei Herrn Prof. Robert Jaster bedanken, der nach dem Tod von Prof. Emmrich eine große Stütze für die Forschungsgruppe war und es mir ermöglichte, meine Forschungsarbeiten für die Dissertation fortzuführen. Bei Frau Dr. Gisela Sparmann bedanke ich mich für die anfängliche Laboreinarbeitung, die Betreuung während meiner Doktorzeit und für gute Ratschläge und spannende Diskussionen. Für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente gilt Frau Edith Prestin ein besonderer Dank.

Herrn Rainer Dallwig und Herrn Dr. Gerd Krüger von FIM Biotech danke ich für die Bereitstellung von Friedländer Tonmineralien und das Interesse, diese hinsichtlich ihres therapeutischen Potentials im Modellsystem der CED zu untersuchen.

Sani und Stephie vielen Dank für die Hilfe beim Layout!

Mein allergrößter Dank gilt meiner Familie, die mich in jeglicher Hinsicht auf meinem Weg begleitet, gefördert und unterstützt hat.

Sven, ich danke dir für deine Liebe, deinen Rückhalt und die immerwährende Unterstützung. Danke für dein Verständnis, insbesondere in der Endphase, als du, Emilia und Arthur auf mich und auf gemeinsame Aktivitäten verzichten mussten.

Sven, Emilia und Arthur, Mutti und Tommi, Papa und Gerrit, Chrischi und Buschi ohne euren familiären Rückhalt wäre diese Arbeit nicht zu leisten gewesen!

DANKE!!!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht haben.

Anne Breitrück

Rostock, Juni 2015